



**VALEUR ALIMENTAIRE DES FOURRAGES LIGNEUX
CONSOMMÉS PAR LES RUMINANTS
EN AFRIQUE CENTRALE ET OCCIDENTALE**

RAPPORT FINAL

| | |
|---------------------------|--|
| ALLEMAGNE | Universität Hohenheim - Institut für Tierernährung |
| BELGIQUE | CRA Gembloux - Station de Haute Belgique |
| CAMEROUN | IRZV - Yaoundé, Ngaoundéré, Garoua |
| CÔTE D'IVOIRE | IDESSA-DRA - Bouaké |
| FRANCE | CIRAD-EMVT - Maisons-Alfort CIRAD-FORÊT - Nogent/Marne INRA-SRNH - Theix |
| MALI | IER - Sotuba, Niono |
| SÉNÉGAL | ISRA-DRPSA-LNERV - Dakar |
| TCHAD | LRVZ - Farcha, N'Djaména |
| | et |
| BURKINA FASO | IDR - Ouagadougou CIRAD-FORÊT/IRBET - Ouagadougou |
| NOUVELLE-CALÉDONIE | CIRAD-EMVT - Nouméa |

NOVEMBRE 1994

Centre de Coopération internationale en Recherche agronomique pour le Développement
Département d'Élevage et de Médecine vétérinaire
CIRAD-EMVT
10, rue Pierre-Curie 94704 Maisons-Alfort Cedex France



SOMMAIRE DU RAPPORT FINAL

Résumé

Chapitre I : Présentation succincte du programme d'étude de la valeur fourragère des arbres et arbustes d'Afrique tropicale centrale et occidentale

Chapitre II : Caractérisation des disponibilités fourragères ligneuses

Chapitre III : Composition botanique des régimes des ruminants sur parcours - Appétibilité relative des espèces ligneuses

Chapitre IV : Récolte et commercialisation des fourrages ligneux en régions périurbaines

Chapitre V : Echantillonnage des fourrages ligneux - Analyses au laboratoire - Composition chimique et dégradabilité enzymatique

Chapitre VI : Les tanins dans les fourrages ligneux

Chapitre VII : *In vitro* Untersuchungen zur Ermittlung der Verdaulichkeit, des Gehaltes an umsetzbarer Energie und des Proteinverfügbarkeit bei tropischen Futterbäumen und Büschen

In vitro studies for the prediction of digestibility, metabolisable energy content and protein fermentability of shrubs and tree fodders

(Mesures *in vitro* de la digestibilité pour estimer les teneurs en énergie métabolisable et en azote dégradable dans le rumen des fourrages ligneux)

Chapitre VIII : Prévion par la spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR) de la composition chimique et de la dégradabilité enzymatique ou *in vitro* des fourrages ligneux

Chapitre IX : Dégradabilité *in situ* de la matière sèche et des matières azotées de quelques fourrages ligneux : application des méthodes *in sacco* à l'étude de la digestion dans le rumen et dans les intestins

Chapitre X : Ingestion et digestibilité *in vivo* des fourrages ligneux

Chapitre XI : Essais d'alimentation de moutons avec des fourrages ligneux

Conclusion générale

Annexe I : Liste des espèces ligneuses enregistrées au catalogue CIRAD-EMVT/Laboratoire d'Ecologie végétale de l'Université Paris-Sud et des espèces ligneuses et subligneuses échantillonnées et étudiées sur l'animal

Human Resource Training - Equipment

→ **Liste des Abréviations**

CHAPITRE VI

LES TANINS DANS LES FOURRAGES LIGNEUX¹

par

Colette GRILLET*, Francis VILLENEUVE**

* CIRAD-EMVT, 2477 Avenue du Val de Montferrand,
B.P. 5035 - 34060 Montpellier Cedex (France)

** (décédé en 1992) CIRAD-Forêt, 45 Avenue de la Belle Gabrielle
94130 Nogent sur Marne (France)

* GRILLET (Colette), VILLENEUVE (F.) - 1994. Les tanins dans les fourrages ligneux. Chapitre VI In: GUERIN (H.) éd. Valeur alimentaire des fourrages ligneux consommés par les ruminants en Afrique centrale et de l'ouest. Commission des Communautés Européennes DG XII. Programme ST2/89/215. Maisons-Alfort, CIRAD-EMVT.

INTRODUCTION

Les tanins végétaux sont des phénols hydrosolubles qui se caractérisent par leur propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. On distingue habituellement (figure VI.1) :

- les tanins hydrolysables qui sont des polyesters d'hydrates de carbone (comme le glucose) et de noyaux phénoliques carboxylés de l'acide gallique ou de l'acide ellagique (Swain, 1965). Ils sont facilement hydrolysés par la chaleur en milieu acide ou par des enzymes ;
- les tanins condensés (proanthocyanidines), sous-groupes des oligomères flavanoliques, qui sont des polymères de flavane-3-ol (catéchine) ou de flavan 3-4 diol (leucoanthocyanidine) ; ils sont polymérisés par la chaleur en milieu acide.

Le grand nombre de noyaux phénoliques hydroxylés des tanins leur permet de former des complexes avec les protéines (Swain, 1965) et avec d'autres molécules comme les hydrates de carbones (Reddy *et al.*, 1985), les vitamines (Carrera *et al.*, 1973), les minéraux, les ions métalliques en particulier (Hartley, 1981 ; Reddy *et al.*, 1985 ; Rao *et al.*, 1988), les structures membranaires des microorganismes (Singleton, 1981).

Si les plantes herbacées sont particulièrement riches en tanins condensés (Mc Leod, 1974), les deux catégories de tanins sont présentes dans les feuilles des fourrages ligneux (Waterman *et al.*, 1980, Diagayete *et al.*, 1982 ; Coley, 1983 ; Lohan *et al.*, 1983 ; Reed *et al.*, 1985 ; Mole *et al.*, 1987 ; Leinmüller *et al.*, 1991).

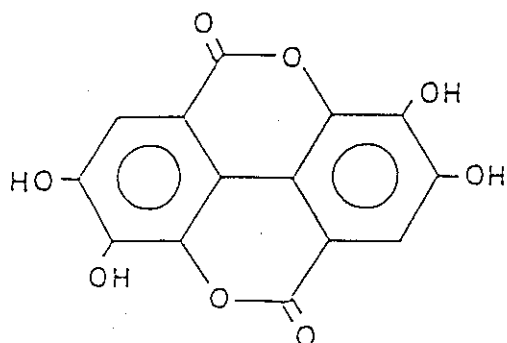
La très grande affinité des tanins pour les protéines est une des causes majeures de leur effet sur la valeur alimentaire des fourrages ligneux : d'une part la précipitation des protéines salivaires par les tanins (Mehansho *et al.*, 1987) ainsi que leur adhérence à la muqueuse buccale (phénomène d'astringence) diminuent l'acceptabilité des fourrages par les animaux, d'autre part la complexation des tanins avec les protéines alimentaires et avec les membranes bactériennes le long du tractus digestif expliquent les effets plus ou moins négatifs des tanins sur la digestibilité des fourrages ligneux.

Dans le but d'étudier ces effets sur l'utilisation digestive des protéines, les tanins ont été dosés sur différentes espèces de ligneux. De nombreuses techniques de dosage étant décrites dans la littérature, dans un premier temps, nous avons donc testé différentes méthodes afin d'identifier une technique, applicable sur un grand nombre d'échantillons, qui permet une bonne estimation des tanins ayant un effet sur les protéines.

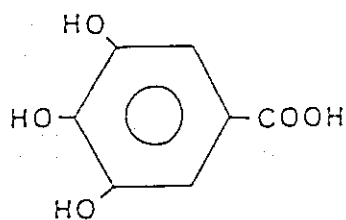
Dans un deuxième temps, l'effet des tanins sur la valeur digestive des fourrages ligneux a été abordé.

Figure VI.1 - Exemples de molécules de tanins hydrolysables et condensés.
 Tanins hydrolysables (d'après Deshpande 1986, Leinmüller *et al.*, 1991)

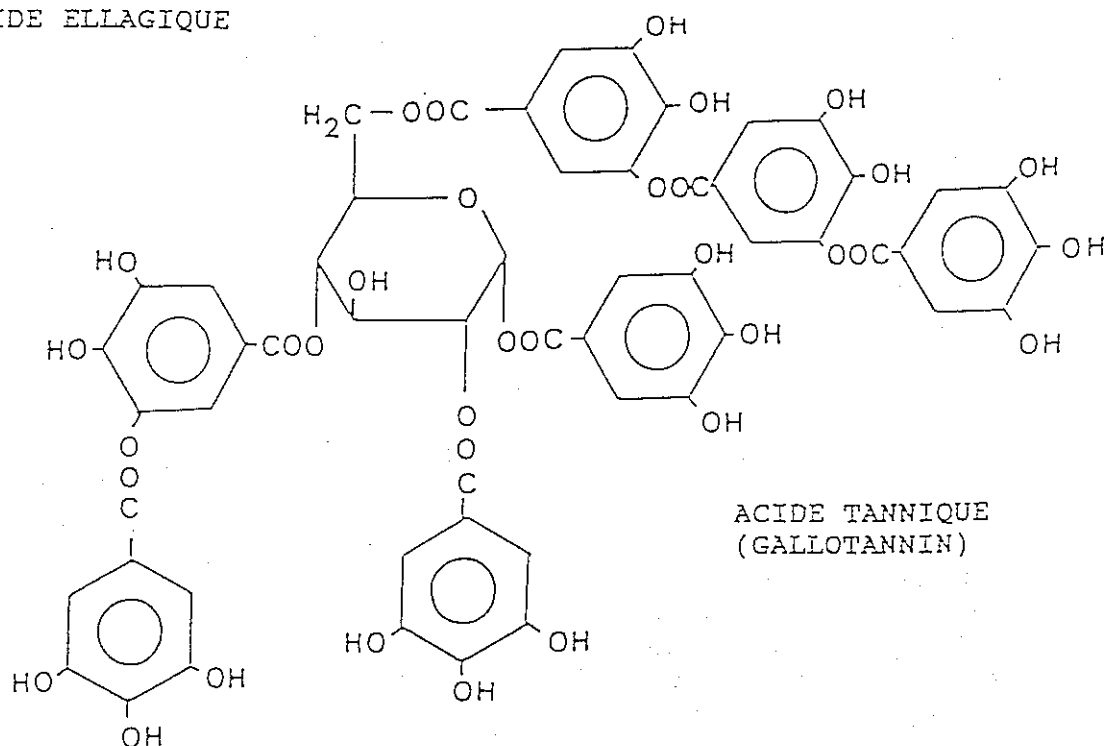
TANINS HYDROLYSABLES



ACIDE ELLAGIQUE

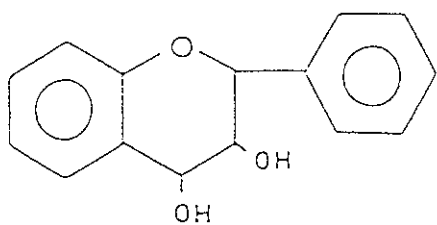


ACIDE GALLIQUE

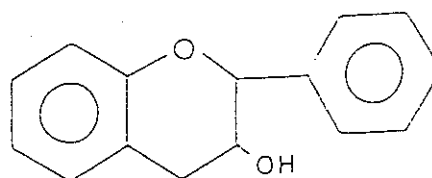


ACIDE TANNIQUE
(GALLOTANNIN)

TANINS CONDENSES



FLAVAN-3,4-DIOL
(leucoanthocyanidine)



FLAVAN-3-OL
(catéchine)

1. CHOIX DES METHODES DE DOSAGE

1.1. Principales fractions de polyphénols et principes des méthodes de détermination

Les dosages peuvent être :

- quantitatifs

- . non spécifiques : dosage des phénols totaux (PT), des oligomères flavanoliques totaux (OFT) qui permettent une estimation globale des phénols ;
- . spécifiques d'une catégorie de tanins : dosage des tanins condensés (TC) ou bien des tanins hydrolysables (TH) ;
- . liés à un effet biologique, par exemple¹ dosage des tanins hydrolysables et condensés par précipitations des protéines (TP) ; cette technique ne permet pas la distinction entre TC et TH ;

-qualitatifs : identification par HPLC.

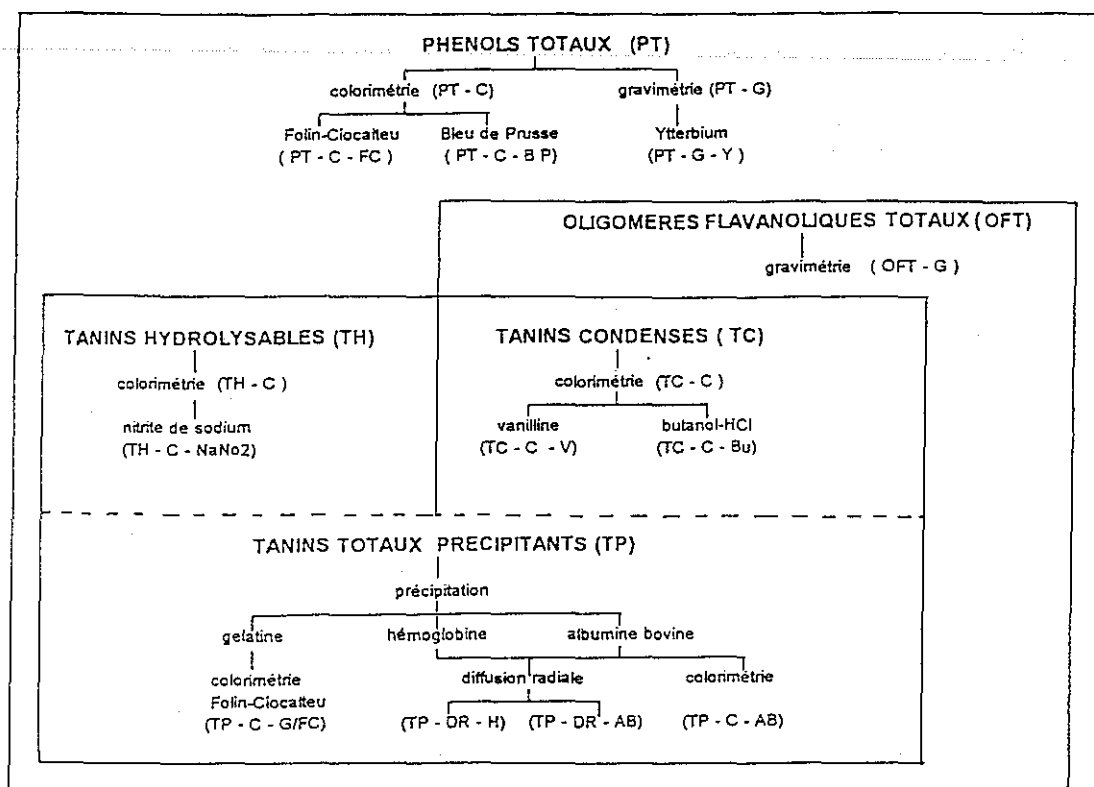
Différentes techniques ont été testées sur des échantillons de ligneux dans le but d'en identifier une ou plusieurs, d'application facile sur un grand nombre d'échantillons, permettant une bonne estimation des tanins ayant un effet sur les protéines alimentaires.

Elles visent donc à déterminer les phénols totaux (PT), les oligomères flavanoliques totaux (OFT), les tanins hydrolysables (TH), les tanins condensés (TC), ou le pouvoir précipitant des tanins (TP) considérés globalement (TC et TH).

Les autres lettres d'abréviation servant à citer les techniques de dosage dans les tableaux évoquent leur principe et les principaux réactifs : C pour colorimétrie, G pour gravimétrie, DR pour diffusion radiale ; les réactifs et leurs abréviations sont mentionnés dans la liste des méthodes et le diagramme résumant les possibilités de fractionnement des polyphénols (figure VI.2).

¹ D'autres méthodes utilisent les propriétés de blocage enzymatique des tanins.

Figure VI.2 - Diagramme décrivant les possibilités de fractionnement des polyphénols



Onze techniques de dosage ont donc été testées :

- a) dosage des phénols totaux
 - . par colorimétrie
 - au Folin-Ciocalteu (PT-C-FC) (Marigo, 1973) (20 échantillons) ;
 - au Bleu de Prusse (PT-C-BP) (Price et Butler, 1977) (28 échantillons) ;
 - . par gravimétrie
 - précipitation à l'ytterbium (PT-G-Y) (Reed *et al.*, 1985) (13 échantillons) ;
 - . par chromatographie
 - chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) (technique appliquée au NRI) (26 échantillons)
- b) dosage des oligomères flavanoliques totaux (OFT) par gravimétrie (OFT-G) Masquelier *et al.*, 1979) (13 échantillons) ;
- c) dosage des tanins condensés (TC) par colorimétrie
 - après condensation des proanthocyanidines avec la vanilline en milieu acide (TC-C-V) (Brun, 1987) (13 échantillons) ;

- après hydrolyse acide des proanthocyanidines en milieu butanolique (TC-C-Bu) (Scalbert *et al.*, 1987) (105 échantillons) ;

d) dosage des tanins hydrolysables (TH) par colorimétrie après oxydation par le nitrite de sodium (TH-C-NaNO₂) (Scalbert *et al.*, 1987) (5 échantillons) ;

e) dosage des tanins précipitants (TP) : (totaux = hydrolysables + condensés)

. par colorimétrie

- après précipitation de la gélatine et réaction au Folin-Ciocalteu (TP-C-G/FC) (Marigo, 1973) (18 échantillons) ;

- après précipitation de l'albumine bovine (TP-C-AB) (Hagerman et Butler, 1978) (456 échantillons) ;

. par diffusion radiale (Hagerman, 1987)

- après précipitation de l'albumine bovine (TP-DR-AB) (5 échantillons) ;

- après précipitation de l'hémoglobine (TP-DR-H) (28 échantillons).

Une même fraction de phénols peut donc être déterminée par plusieurs méthodes qui diffèrent dans leurs principes, ce qui explique par avance la variabilité des données bibliographiques et celle qui ressort du tableau VI.1.

Selon les techniques utilisées (tableau VI.1), les résultats présentent en effet une grande hétérogénéité : pour certaines espèces, aucuns tanins totaux n'ont été dosés alors que les teneurs en tanins condensés ne sont pas nulles (ex. *Sesbania rostrata*). De même, certaines teneurs en oligomères flavanoliques totaux sont plus faibles que les teneurs en tanins condensés (ex. *Acacia linearoides*). Pour certains échantillons, les teneurs en polyphénols obtenues par dosage à l'ytterbium sont surestimées (ex. *Gardenia ternifolia*).

Tableau VI.1 - Teneurs en diverses fractions polyphénoliques de quelques espèces ligneuses (Villeneuve, 1991)

(en g d'équivalent étalon p.100 g de MS ; étalon variable suivant la méthode : 1. acide ellagique ; 2. p.100 de MS ; 3. catechine ; 4. acide tanique)

| METHODE | PHENOLS ¹ TOTAUX PT-C-FC. | PHENOLS ² TOTAUX PT-G-Y | OFT- ² G | Tanins ³ condensés TC-C-V | Tanins ¹ précipitants TP-C-G/FC | Tanins ⁴ précipitants TP-C-AB |
|-----------------------------|--|--|------------------------|--|--|--|
| <i>Boscia senegalensis</i> | 0.3 | 2.1 | 0.5 | 0.2 | 0.0 | 0.0 |
| <i>Balanites aegyptiaca</i> | 0.5 | 0.0 | 0.5 | 0.3 | 0.0 | 0.1 |
| <i>Sesbania rostrata</i> | 1.1 | 0.0 | 0.3 | 0.8 | 0.1 | 0.1 |
| <i>Rhigozum somalense</i> | 1.5 | 4.8 | 6.3 | 1.6 | 0.9 | - |
| <i>Acacia linearoides</i> | 4.1 | 0.3 | 0.2 | 0.6 | 2.3 | 0.8 |
| <i>Gardenia ternifolia</i> | 5.7 | 29.4 | 1.5 | 1.6 | 3.4 | - |
| <i>Acacia ataxacantha</i> | 9.3 | 19.6 | 3.7 | 1.4 | 6.9 | 8.6 |
| <i>Acacia meamsii</i> | 24.6 | 31.2 | 2.7 | 3.6 | 4.8 | 1.1 |

Selon la méthode de détermination, la hiérarchie des espèces est différente ; cependant, certaines espèces apparaissent globalement riches en tanins, d'autres pauvres.

De nombreux autres facteurs peuvent faire varier les résultats obtenus pour une même méthode.

I.2. Influence du mode de conditionnement des échantillons

Les tanins sont supposés être dans les vacuoles des cellules fraîches (Mc Leod, 1974 ; Terrill *et al.*, 1990). Lors du séchage, le rétrécissement des vacuoles permettrait le contact des tanins avec les protéines membranaires. La complexation tanin-protéines, ainsi qu'une polymérisation et une oxydation des tanins par la chaleur (Golstein et Swain, 1963), pourraient expliquer la diminution des teneurs en tanins observée sur les échantillons séchés ; ceci d'autant plus que la température est élevée (Terrill *et al.*, 1990). L'hypothèse est donc faite qu'un séchage à l'air libre devrait entraîner une dénaturation des tanins moins importante qu'à l'étuve.

En début de programme, cinq échantillons ont donc été conservés dans les mêmes conditions que celles appliquées par Ho-Ahn *et al.*, (1989) et Terrill *et al.*, 1990 en vue de déterminer les conséquences d'un séchage systématique à l'air, le plus adapté aux conditions logistiques du projet.

Les échantillons frais ou congelés, lyophilisés, séchés à l'air ou à l'étuve à 60°C ont été analysés pour leurs teneurs en :

SOMMAIRE

| | Page |
|--|------|
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. CHOIX DES METHODES DE DOSAGE | 3 |
| 1.1. Principales fractions de polyphénols et principes des méthodes de détermination | 3 |
| 1.2. Influence du mode de conditionnement des échantillons | 6 |
| 1.3. Influence du mode d'extraction | 10 |
| 1.4. Influence du choix des étalons de référence pour calibrer les réactions colorimétriques | 11 |
| 1.5. Relations entre les résultats obtenus dans plusieurs laboratoires et/ou par plusieurs méthodes | 12 |
| 1.6. Détermination qualitative des phénols par HPLC | 13 |
| 1.7. Conclusion sur le choix des méthodes | 16 |
| 2. TENEURS EN TANINS DE QUELQUES LIGNEUX D'AFRIQUE CENTRALE ET DE L'OUEST | 17 |
| 2.1. Matériel et méthode | 17 |
| 2.1.1. Matériel | 17 |
| 2.1.2. Méthode | 17 |
| 2.2. Résultats | 17 |
| 3. EFFETS DES TANINS SUR LA VALEUR ALIMENTAIRE DES FOURRAGES LIGNEUX | 23 |
| 3.1. Rappels bibliographiques | 23 |
| 3.1.1. Effet des tanins sur l'ingestion | 23 |
| 3.1.2. Effet sur la digestibilité de la fraction fibreuse .. | 23 |
| 3.1.3. Effet sur la digestibilité de l'azote | 23 |
| 3.2. Etude expérimentale | 24 |
| CONCLUSION | 26 |
| BIBLIOGRAPHIE | 29 |

- phénols totaux (PT-C-FC) (PT-G-Y)
- oligomères flavanoliques totaux (OFT-G)
- tanins hydrolysables (TH-C)
- tanins condensés (TC-C-V) ou (TC-C-Bu)
- tanins précipitants (TP-C-G/FC).

Conformément aux résultats de la bibliographie (cf. ci-dessus), le mode de séchage a affecté différemment les teneurs en phénols selon l'espèce et la technique de dosage (tableau VI.2 et figure VI.3). Globalement, les échantillons séchés à l'étuve avaient les teneurs les plus basses et ce mode de conditionnement masquait les hiérarchies entre espèces qui pouvaient être établies avec les échantillons conservés par d'autres techniques. Les échantillons frais avaient les teneurs les plus élevées mais ceux qui ont été lyophilisés ou séchés à l'air se classaient dans le même ordre.

Compte tenu de l'intérêt irrégulier du dosage sur des échantillons frais ou lyophilisés, comparativement à des échantillons séchés à l'air, c'est ce dernier mode de conservation qui a été finalement adopté pour des dosages en série.

Tableau VI.2 - Teneurs en polyphénols (en g d'équivalent étalon/100 g de MS) en fonction des techniques de dosage utilisées et en fonction du mode de séchage des échantillons

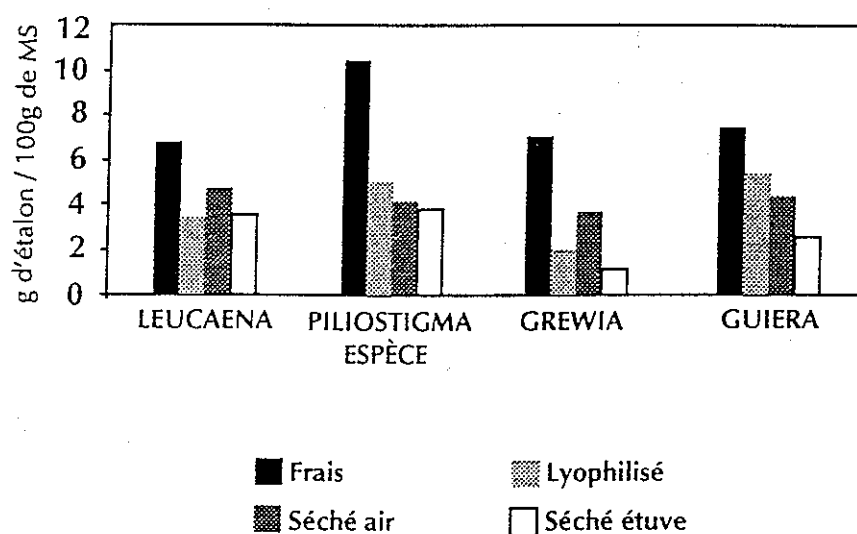
| METHODE | SECHAGE | Leucaena leucocephala | Piliostigma reticulatum | Grewia bicolor | Guiera senegalensis | Calotropis procera |
|--|-----------|--------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
| PHENOLS TOTAUX PT-C-F (1) | Frais | 6.8 | 10.6 | 7.2 | 7.6 | 1.4 |
| | Lyoph. | 3.5 | 5.1 | 2.1 | 5.6 | - |
| | Sec Air * | 4.7 | 4.3 | 3.9 | 4.6 | 0.0 |
| | SecEtuve* | 3.6 | 3.9 | 1.3 | 2.8 | 0.3 |
| PHENOLS TOTAUX PT-G-Y (2) | Frais | 13.9 | 6.9 | 10.9 | 24.2 | 0.0 |
| | Lyoph. | 9.2 | 8.7 | 9.9 | 15.6 | - |
| | Sec Air | 8.6 | 5.2 | 8.4 | 7.8 | 0.0 |
| | SecEtuve | 10.7 | 5.1 | 11.0 | 9.0 | 0.0 |
| OFT OFT-G (2) | Frais | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 1.4 | 0.0 |
| | Lyoph. | 0.6 | 0.3 | 0.4 | 0.8 | - |
| | Sec Air | 1.8 | 0.4 | 1.0 | 1.6 | 0.4 |
| | SecEtuve | 0.8 | 0.5 | 0.8 | 0.7 | 0.9 |
| Tanins condensés TC-C-V (1) | Frais | 2.6 | 3.0 | 2.7 | 1.4 | 0.0 |
| | Lyoph. | 3.5 | 4.1 | 1.8 | 2.4 | - |
| | Sec Air | 1.3 | 2.4 | 2.5 | 0.5 | 0.2 |
| | SecEtuve | 1.7 | 2.0 | 0.7 | 0.4 | 0.2 |
| Tanins condensés TC-C-Bu (3) | Frais | 0.7 | 6.0 | 3.5 | 0.0 | 0.0 |
| | Lyoph. | 1.6 | 2.9 | 2.8 | 0.6 | - |
| | Sec Air | 1.5 | 3.6 | 0.4 | 0.5 | 0.2 |
| | SecEtuve | 1.9 | 2.0 | 1.3 | 0.4 | 0.3 |
| Tanins hydrolysables TH-C-NaNo2 (4) | Frais | - | - | - | - | - |
| | Lyoph. | 7.3 | 9.9 | 8.4 | 8.6 | - |
| | Sec Air | 10.0 | 8.6 | 3.0 | 1.5 | 0.9 |
| | SecEtuve | 8.0 | 7.6 | 1.7 | 1.3 | 2.1 |
| Tanins précipitants TP-C-G/FC (1) | Frais | 3.0 | 8.0 | 4.9 | 1.9 | 0.6 |
| | Lyoph. | 1.3 | 3.6 | 1.9 | 2.1 | - |
| | Sec Air | 2.0 | 2.7 | 3.7 | 2.4 | 0.0 |
| | SecEtuve | 2.3 | 2.5 | 0.9 | 1.2 | 0.1 |
| Tanins précipitants TP-C-AB (5) | Frais | 1.16 | 1.9 | 3.6 | 2.3 | - |
| | Lyoph. | 1.57 | - | - | 6.1 | - |
| | Sec Air | 2.35 | 3.8 | 3.4 | 4.7 | 0.0 |
| | SecEtuve | 0.90 | 3.6 | 1.4 | 1.4 | 0.0 |

Etalon : (1) - catéchine. (2) - p.100 de MS. (3) - cyanidine. (4) - acide ellagique. (5) - acide tanique.

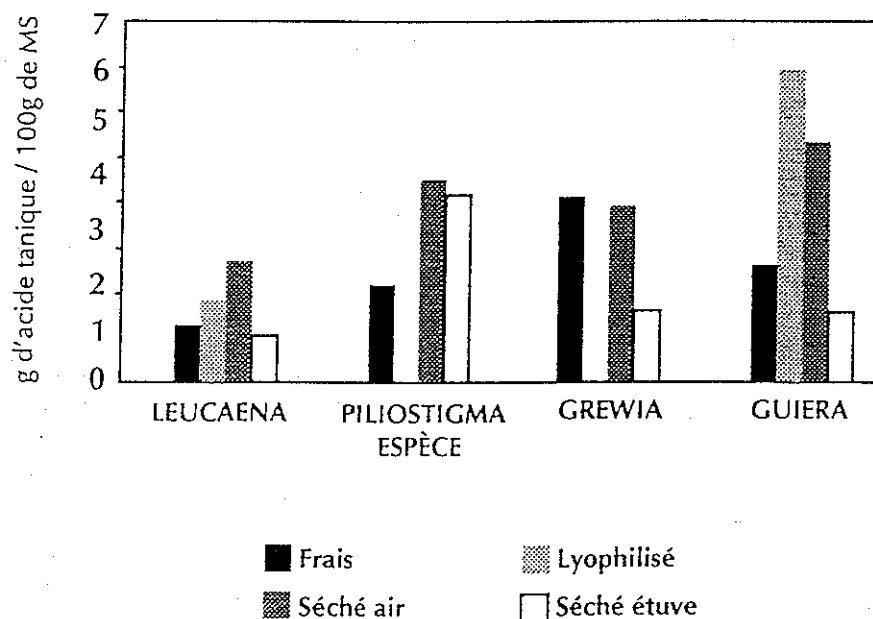
* séchage à l'air à 23° C - séchage à l'étuve à 60° C pendant 72 h.

Figure VI.3 - Teneurs en phénols totaux (PT-C-FC) et en tanins précipitants (TP-C-AB) de quatre espèces ligneuses suivant le mode de conservation des échantillons (cf. d'après tableau VI.2)

PHÉNOLS TOTAUX



TANINS PRÉCIPITANTS



I.3. Influence du mode d'extraction

Les paramètres qui caractérisent le mode d'extraction sont nombreux : le poids de la prise d'essai et le volume d'extraction ; le dégraissage préalable des échantillons ; le choix du solvant et son élimination avant dosage ; la durée d'extraction.

La méthode retenue au début du projet (Villeneuve, 1991) est celle de Scalbert *et al.* (1987) qui a été progressivement adaptée (simplifications avec contrôle des résultats) (Grillet, 1993) et comparée à celle appliquée par le NRI et l'Université de Hohenheim (tableau VI.3).

Tableau VI.3 - Simplification de la technique d'extraction de Scalbert *et al.* (1987) par Grillet (1992) : comparaison à celles appliquées à l'Université de Hohenheim et au NRI

| | CIRAD-Forêt 1991(1) | CIRAD-EMVT 1992-1993(2) | Uni. Hohenheim (3) | NRI(4) |
|-------------------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------|---------|
| Solvant | Méthanol | Méthanol | Méth./acétone(5) | Acétone |
| Durée d'extraction | 2 h | 1 h | entre 3 et 60mn | 1 mn |
| Volume d'extraction | 100 ml | 5 ml | variable | 5 ml |
| Prise d'essai | 1 g | 100 mg | variable | 500 mg |
| Extraction préalable des lipides | oui | non | variable | non |
| Élimination du méthanol | oui | non | variable | non |

(1) d'après Scalbert *et al.*, 1987 ; (2) Grillet, 1993 ; (3) Leinmüller, 1989 ; (4) Wood (communication personnelle) ; (5) Phénols totaux et tanins condensés : acétone 70 p.100. Tanins précipitants : méthanol 50 p.100.

Comme l'ont déjà signalé Terrill *et al.*, (1990), la nature du solvant influence les résultats : Grillet (1993) a comparé les teneurs en phénols totaux (PT-C-BP) de trois espèces en faisant varier le solvant, méthanol ou acétone, ainsi que la durée et le mode d'agitation ; (agitation magnétique pendant 1 heure ou homogénéisation par ultra turrax pendant 1 minute) (tableau VI.4).

Tableau VI.4 - Teneur en phénols totaux (PT-C-BP) en fonction du mode d'extraction (en DO/g de MS) (Grillet, 1993 - Résultats obtenus au NRI)

| | Méthanol 70 p.100 Agitation magnétique 1 heure | Méthanol 70 p.100 ultra turrax 1 min | Acétone 70 p.100 ultra turrax 1 min |
|----------------------------|--|---|--|
| <u>Combretum aculeatum</u> | 460 | 385 | 712 |
| <u>Ziziphus mauritiana</u> | 181 | 232 | 336 |
| <u>Mangifera indica</u> | 610 | 655 | 736 |

I.5. Relations entre les résultats obtenus dans plusieurs laboratoires et/ou par plusieurs méthodes

En dépit de ces variations il est utile de vérifier la cohérence des résultats obtenus par diverses méthodes et/ou dans plusieurs laboratoires. A cette fin, les relations entre les teneurs en phénols totaux (PT-C-FC), en tanins condensés (TC-C-Bu) et en tanins précipitants (TP-C-AB) mesurés sur 12 à 18 échantillons (suivant les méthodes) à l'Université de Hohenheim et au CIRAD-EMVT, ont été calculées. Malgré des étalons différents, les relations sont précises et permettent une bonne prédiction des résultats d'un laboratoire à partir de ceux obtenus dans l'autre (tableau VI.6).

Tableau VI.6 - Relations entre les teneurs en tanins (en g d'équivalent étalon/100 g MS) mesurés à l'Université de Hohenheim (*) et au CIRAD-EMVT

| DOSAGE | MOY | ETALON | SD | MIN | MAX | R | ETR | N |
|-----------|-----|-----------------------|-----|-----|------|------|-----|----|
| PT-C-FC 1 | 6.6 | A.GALLIQUE | 6.5 | 2.2 | 26.2 | 0.96 | 1.8 | 12 |
| 2 | 4.9 | A.GALLIQUE | 6.5 | 0.7 | 24.8 | | | |
| TC-C-Bu 1 | 0.5 | CYANIDINE | 0.6 | 0 | 2.3 | 0.89 | 0.3 | 18 |
| 2 | 7.2 | Combretum Collinum | 1.6 | 0 | 20.1 | | | |
| TP-C-AB 1 | 1.4 | A.TANIQUE | 1.5 | 0 | 5.3 | 0.91 | 0.7 | 15 |
| 2 | 7.2 | prot.précipitée | 7.2 | 0 | 24.3 | | | |

PT-C-FC : phénols totaux (Folin Ciocalteu) ; TC-C-Bu : tanins condensés (butanol-HCl) ; TP-C-AB : tanins précipitant l'albumine bovine.

1-EMVT ; 2-Hohenheim ; * résultats de Leinmüller (1989)

Par ailleurs, des ensembles d'échantillons furent analysés au CIRAD-Forêt puis au CIRAD-EMVT par plusieurs méthodes parmi celles décrites ci-dessus. Les coefficients de corrélation ont été calculés deux à deux. Ils mettent en évidence les liaisons étroites entre les phénols totaux et celles en tanins précipitants ou condensés (tableau VI.7).

Tableau VI.7 - Corrélations entre différentes techniques de détermination des polyphénols des fourrages ligneux (n = 5 à 100)

| | PHENOLS TOTAUX | | | OFT I G | Tanins condensés | | Tanins précipitants | |
|-----------|----------------|---------|--------|---------------|------------------|--------|------------------------|---------|
| | PT-C-FC | PT-C-BP | PT-G-Y | | TC-C-V | TC-C-B | TP-C-G/FC | TP-C-AB |
| PT-G-Y | 0.827 | | 1 | | | | | |
| OFT-G | 0.323 | | 0.323 | 1 | | | 0.312 | |
| TH-C-Na | 0.756 | | 0.122 | | | | 0.811 | |
| TC-C-V | 0.867 | | 0.726 | 0.431 | 1 | | 0.684 | |
| TC-C-Bu | 0.973 | | 0.417 | -0.525 | 0.952 | 1 | 0.809 | |
| TP-C-G/FC | 0.869 | | 0.689 | | | | 1 | |
| TP-C-AB | 0.969 | 0.804 | | | | 0.572 | | 1 |
| TP-DR-AB | 0.956 | | | | | 0.963 | | 0.982 |
| TP-DR-H | | 0.849 | | | | | | 0.779 |

Les valeurs en gras sont significatives pour $p < 0.01$.

Pour une technique d'agitation identique (1 minute à l'Ultra turrax), l'extraction à l'acétone est plus performante. Cependant ce solvant ne peut pas être retenu pour toutes les techniques : l'acétone précipitant les protéines, il doit être éliminé en totalité pour les méthodes mesurant cette propriété commune aux tanins, excepté pour la technique par diffusion radiale (d'après Hagerman, 1987).

Les durées d'extraction préconisées dans la littérature varient de 20 min à 24 h (Leinmüller *et al.*, 1991). D'après les résultats du tableau VI.4, une extraction d'une minute sous agitation rapide (ultra turrax) semble même suffisante. De plus, aucune différence n'a été observée entre les résultats obtenus après 1 h ou 2 h d'agitation (résultats non publiés de Grillet (1992) sur 5 échantillons). Villeneuve (1991) avait fait la même observation.

Les phénols sont des molécules facilement oxydables, des temps d'extraction trop longs peuvent donc entraîner une sous-estimation de leurs teneurs (Price *et al.*, 1978 ; Kuhla *et al.*, 1981), il est donc préférable de rechercher les techniques d'extraction les plus rapides.

1.4. Influence du choix des étalons de référence pour calibrer les réactions colorimétriques

Les composés phénoliques totaux et les tanins peuvent par exemple être exprimés par rapport à deux étalons choisis arbitrairement parmi la liste des composés phénoliques disponibles à l'état pur : la catéchine, monomère de tanin condensé, et l'acide ellagique, monomère de tanin hydrolysable. Les résultats rapportés au tableau VI.5 montrent des différences liées aux choix de l'étalon mais elles sont faibles par rapport à celles dues aux facteurs étudiés (espèce et mode de conservation).

Tableau VI. 5 - Phénols totaux (PT-C-FC g eq. étalon/100 g de matière sèche)

| | Frais | | Lyophilisé | | Sec. à l'air 23°C | | Sec. à l'étuve 60°C 72 h | |
|-------------------------|-------|-------|------------|------|----------------------|------|-----------------------------|-----|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Leucaena leucocephala | 6,84 | 7,16 | 3,48 | 4,06 | 4,7 | 5,5 | 3,6 | 4,2 |
| Piliostigma reticulatum | 10,58 | 12,14 | 5,07 | 5,87 | 4,3 | 4,99 | 3,9 | 4,6 |
| Grewia bicolor | 7,24 | 8,31 | 2,13 | 2,53 | 3,95 | 4,6 | 1,3 | 1,6 |
| Calotropis procera | 1,43 | 1,33 | - | - | 0 | 0,07 | 0,3 | 0,4 |
| Guiera senegalensis | 7,63 | 8,82 | 5,58 | 6,46 | 4,6 | 5,4 | 2,8 | 3,3 |

1 = catéchine ; 2 = acide ellagique

Quoi qu'il en soit, divers auteurs, dont Villeneuve (1991) citant Ribereau Gayon (1968) soulignent qu'une des difficultés de l'étude des tanins réside dans le fait que l'on compare la réactivité de mélanges de molécules à celle de composés "étalons" choisis arbitrairement et n'appartenant au mieux qu'à une des familles chimiques étudiées.

En revanche, malgré une liaison étroite entre les deux méthodes de détermination des tanins condensés, seule celle utilisant le butanol est bien corrélée avec l'effet précipitant des tanins en particulier lorsqu'il est mesuré par diffusion radiale.

Ces observations confirment la conclusion de Villeneuve (1991) suivant laquelle la détermination des phénols totaux au Folin-Ciocalteu complétée par celle des tanins condensés avec le n-butanol donnait une idée suffisante et cohérente du contenu tanique des fourrages ligneux. En revanche, les dosages des tanins hydrolysables (TH) ont été trop peu nombreux pour étudier la relation entre ce dosage et le pouvoir précipitant.

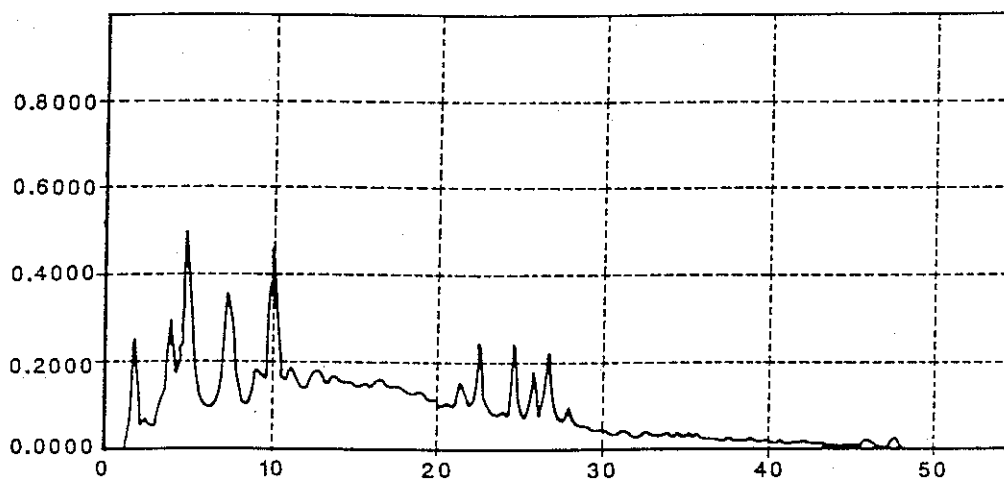
I.6. Détermination qualitative des phénols par HPLC

Malgré les fractionnements, les méthodes de dosage globales des tanins ne rendent pas compte de leur diversité chimique et donc des variations d'activité biologique. Il est nécessaire pour cela de faire appel à la connaissance structurale des molécules, à leur activité propre et à leurs proportions relatives dans les ligneux. Les techniques modernes telles que l'HPLC peuvent renseigner sur ces points, espèce végétale par espèce végétale. Les spectres obtenus au NRI (Grillet, 1993) sur trois espèces présentent des pics différents, mais ils n'ont pas été interprétés quantitativement (figures VI.4 et VI.5). Vingt-trois autres échantillons ont été étudiés par la même technique.

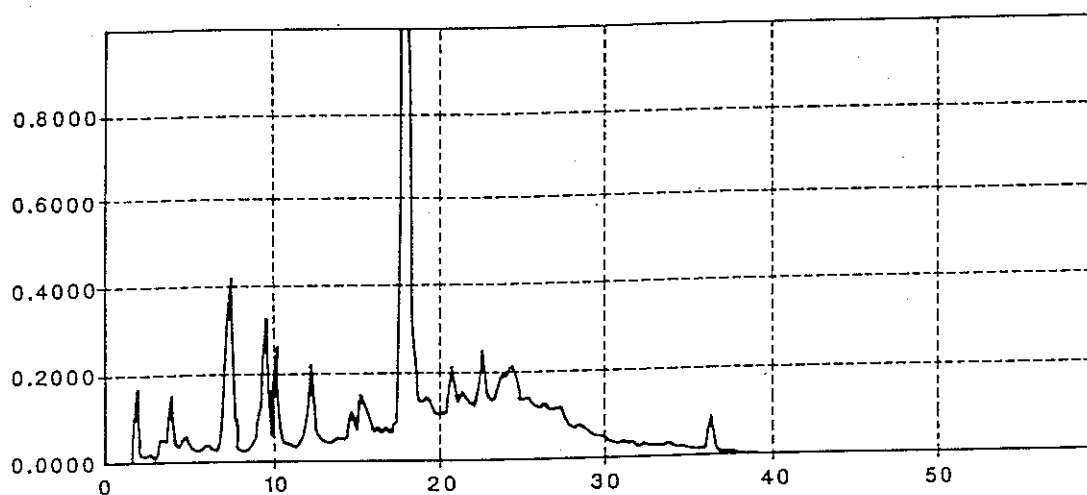
L'étape suivante consisterait à déterminer la nature des produits correspondants à ces pics ainsi que leur activité biologique. Il s'agit là d'un programme de travail utile et ambitieux, entrepris en 1993 au NRI, qui n'était pas réalisable dans le cadre de ce projet. Cette nouvelle approche des tanins devrait, en revanche, être incluse dans une étude associée aux effets des régimes à base de ligneux sur l'activité cellulolytique mesurée *in sacco*.

Figure VI.4 - Spectres en HPLC (240 nm) de trois espèces ligneuses soumises à une extraction par le méthanol sous agitation magnétique (entre parenthèses teneur en phénols totaux mesurée par colorimétrie par le bleu de prusse : PT-C-BP)

Combretum aculeatum (460 DO/g MS) (échantillon n° 855)



Mangifera indica (610 DO/g MS) (échantillon n° 1601)



Ziziphus mauritiana (181 DO/g MS) (échantillon n°)

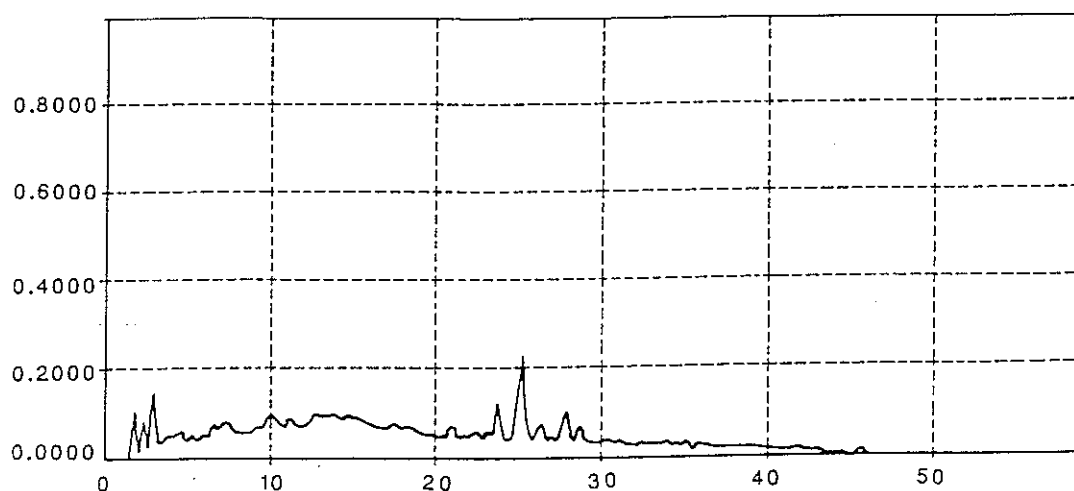
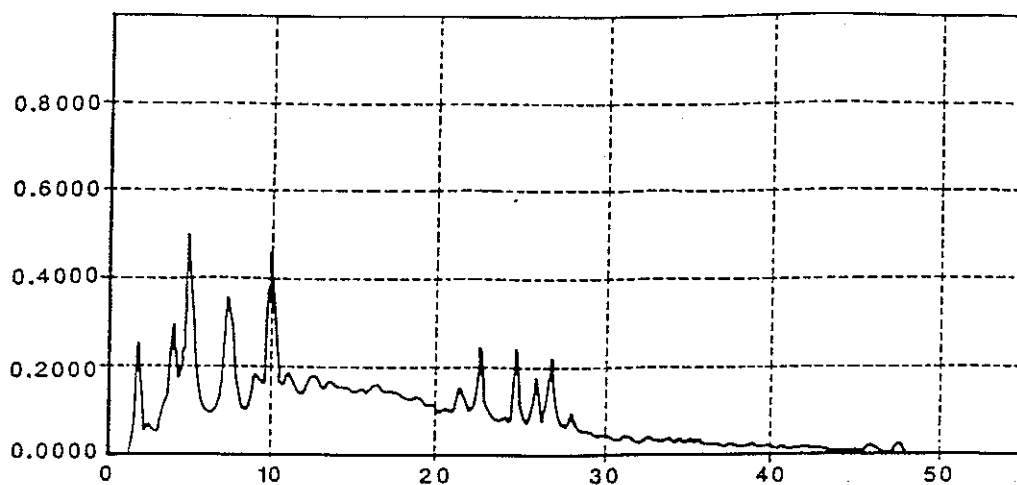
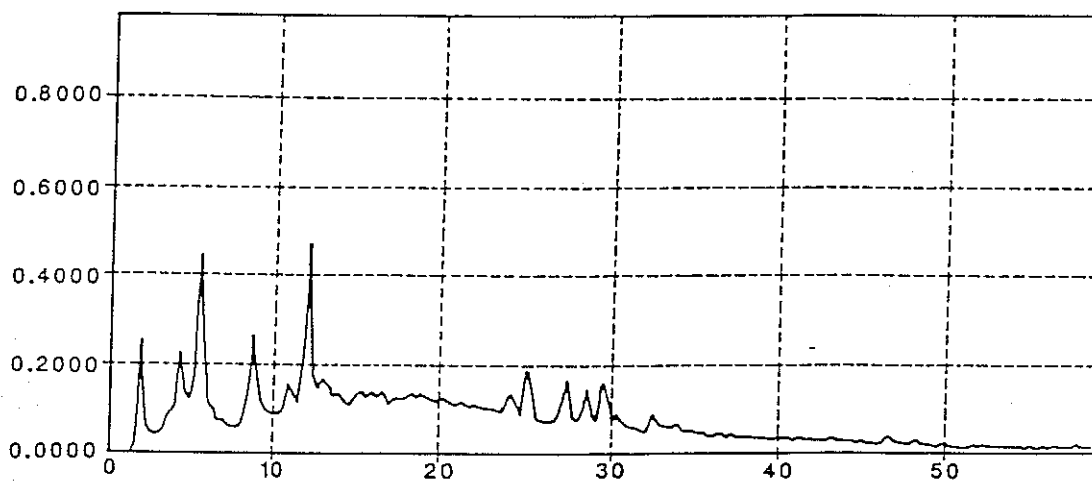


Figure VI.5 - Spectres en HPLC (240 nm) de *Combretum aculeatum* soumis à trois techniques d'extraction

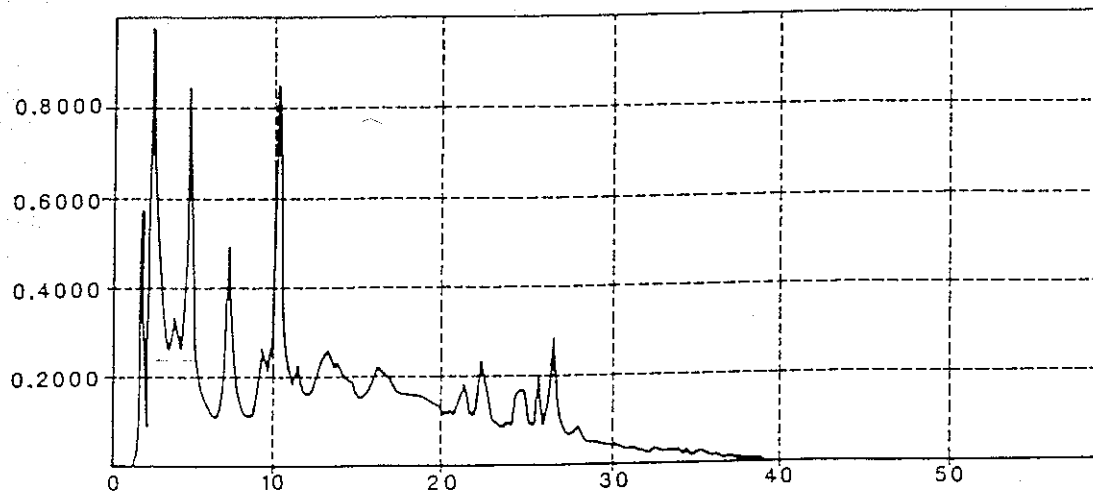
Méthanol sous agitation magnétique (460 DO/g MS) (échantillon n° 855)



Méthanol et homogénéisation par Ultra Turrax (385 DO/g MS)
(échantillon n° 855)



Acétone et homogénéisation par Ultra Turrax (712 DO/g MS)
(échantillon n° 855)



1.7. Conclusion sur le choix des méthodes

Il n'existe actuellement aucune méthode définitivement normalisée pour étudier les tanins des fourrages ligneux.

Après les avoir testés comparativement, Grillet a progressivement éliminé les méthodes de fractionnement en s'appuyant sur les arguments suivants :

- les techniques de dosages des phénols totaux (PT) ne sont pas spécifiques et ne permettent pas de distinguer les phénols de faible poids moléculaire qui n'ont pas d'effet biologique (Deshpande *et al.*, 1986) ;
- tous les flavanes ne sont pas des tanins ; le dosage des OFT entraîne donc une surestimation des tanins variables suivant l'espèce.
- à la différence des fourrages herbacés, les tanins hydrolysables sont importants dans les fourrages ligneux et leur effet précipitant n'est pas moindre que celui des tanins condensés. Il faudrait donc déterminer les deux fractions, ce qui représente un travail très important dans le cas de l'étude de nombreuses espèces.

Le choix d'une technique de mesure du pouvoir précipitant a été orienté par les observations suivantes :

- la mesure de la précipitation de la gélatine par le réactif de Folin-Ciocalteu (TP-C-FC) permet une bonne estimation des tanins totaux, mais la technique est longue et délicate ; il est en particulier difficile d'apprécier le précipité formé par la gélatine ;
- inversement, la mesure de la précipitation des protéines par diffusion radiale est simple et rapide mais l'appréciation des résultats est très subjective ;
- parmi toutes les techniques testées, le dosage par précipitation de l'albumine bovine (Hagerman et Butler, 1978) semble le plus adapté pour mesurer l'activité biologique des tanins sur un grand nombre d'échantillons (Hahn *et al.*, 1984 ; Deshpande *et al.*, 1987 ; Dawra *et al.*, 1988 ; Bernays *et al.*, 1989). Ce fut donc la technique retenue pour caractériser en série les échantillons du projet en analysant en priorité ceux étudiés *in vitro* ou sur l'animal.

Cependant, les liaisons trouvées entre les résultats obtenus par cette méthode et les résultats de digestibilité *in vitro*, *in sacco* ou *in vivo* doivent être précisés : en effet, les valeurs obtenues par cette technique sont des teneurs en tanins précipités et non pas des mesures d'activité précipitantes, qui varient en fonction de la structure des tanins et de la protéine concernée. La détermination simultanée des teneurs en protéines et en tanins du complexe tanin-protéine formé permet d'estimer cette activité (Makkar, 1989). Par cette technique, Leinmüller (1989) observe une bonne corrélation ($p < 0.01$) entre les mesures d'activité précipitantes des tanins et la dégradation des protéines *in vitro*.

2. TENEURS EN TANINS DE QUELQUES LIGNEUX D'AFRIQUE CENTRALE ET DE L'OUEST

2.1. Matériel et méthode

2.1.1. Matériel

Les tanins ont été dosés sur 560 échantillons appartenant à 124 espèces ; pour 39 d'entre elles, 5 échantillons ou plus ont été analysés. Sur tous, les analyses chimiques classiques (MS, MAT, MGE, CBW, NDF, ADF, ADL...), ainsi que des mesures de dégradabilité enzymatique des matières sèche ou organique (dégradabilité à la pepsine cellulase) ou azotée (dégradabilité par la pronase) ont été effectuées. 65 d'entre eux ont fait l'objet d'études de dégradabilité *in vivo*, *in vitro* ou *in sacco*. La fréquence d'une espèce ainsi que sa consommation par le bétail ont été le critère de choix des échantillons.

Pour une même espèce des organes divers (feuilles, fruits, fleurs, graines, tiges...) ainsi que des feuilles à différents stades phénologiques ont été analysés.

2.1.2. Méthode

Les échantillons séchés à 60°C ont été broyés (grille de 1 mm). Les tanins ont été extraits par un mélange méthanol/eau (7/3) (100 mg d'échantillon dans 5 ml de solvant, agitation magnétique pendant 1 heure à température ambiante). Les tanins ont été dosés par la technique de précipitation de l'albumine bovine décrite par Hagermann et Butler (1978). (TP-C-AB) (cf. § 1.1.)

2.2. Résultats

Les teneurs en tanins des feuilles des espèces représentées par au moins 5 échantillons sont présentées dans le tableau VI.8. Celle des fruits dans le tableau VI.9. Les résultats sont exprimés en gramme d'acide tanique pour 100 grammes de matière sèche.

Tableau VI.8 - Teneur en tanins précipitants de feuilles de fourrages ligneux (en g d'acide tanique pour 100 g de MS) (TP-C-AB)

| ESPECE | N | MOY | SD | MIN | MAX |
|--------------------------------|----|------|------|------|-------|
| <i>Azelia africana</i> | 8 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Boscia senegalensis</i> | 14 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Calotropis procera</i> | 8 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Capparis decidua</i> | 7 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Ficus exasperata</i> | 5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Gliricidia sepium</i> | 8 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Leptadenia pyrotechnica</i> | 5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Salvadora persica</i> | 9 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Sesbania rostrata</i> | 7 | 0.07 | 0.10 | 0.00 | 0.24 |
| <i>Balanites aegyptiaca</i> | 12 | 0.08 | 0.19 | 0.00 | 0.58 |
| <i>Morinda lucida</i> | 5 | 0.12 | 0.24 | 0.00 | 0.60 |
| <i>Cordia sinensis</i> | 7 | 0.16 | 0.07 | 0.06 | 0.27 |
| <i>Acacia senegal</i> | 9 | 0.18 | 0.43 | 0.00 | 1.42 |
| <i>Pterocarpus erinaceus</i> | 8 | 0.38 | 0.54 | 0.00 | 1.75 |
| <i>Pithecellobium dulce</i> | 6 | 0.41 | 0.13 | 0.23 | 0.62 |
| <i>Leucaena leucocephala</i> | 5 | 1.08 | 0.58 | 0.28 | 1.62 |
| <i>Spondias mombin</i> | 5 | 1.23 | 0.29 | 0.81 | 1.67 |
| <i>Pterocarpus lucens</i> | 6 | 1.48 | 0.75 | 0.77 | 2.69 |
| <i>Combretum aculeatum</i> | 19 | 1.79 | 0.71 | 0.11 | 3.19 |
| <i>Ficus sycomorus</i> | 38 | 1.97 | 1.44 | 0.00 | 5.02 |
| <i>Hyphaene thebaica</i> | 16 | 2.08 | 0.45 | 1.02 | 2.76 |
| <i>Pencopsis laxiflora</i> | 5 | 2.23 | 0.45 | 1.67 | 2.73 |
| <i>Piliostigma thonningii</i> | 7 | 2.41 | 1.68 | 0.00 | 5.07 |
| <i>Daniella oliveri</i> | 9 | 2.43 | 2.15 | 0.36 | 6.64 |
| <i>Ziziphus mauritiana</i> | 22 | 2.56 | 1.30 | 0.66 | 4.86 |
| <i>Faidherbia albida</i> | 8 | 2.73 | 1.28 | 0.40 | 4.50 |
| <i>Combretum glutinosum</i> | 6 | 2.83 | 0.86 | 1.17 | 3.71 |
| <i>Acacia tortilis</i> | 7 | 3.05 | 1.40 | 1.02 | 4.74 |
| <i>Bauhinia rufescens</i> | 6 | 3.42 | 1.6 | 1.00 | 5.60 |
| <i>Acacia nilotica</i> | 10 | 3.44 | 0.63 | 2.46 | 4.82 |
| <i>Combretum micranthum</i> | 5 | 3.58 | 3.89 | 0.81 | 11.24 |
| <i>Ficus sur forsk</i> | 5 | 3.62 | 2.01 | 0.66 | 6.32 |
| <i>Adansonia digitata</i> | 8 | 4.79 | 2.22 | 2.63 | 9.02 |
| <i>Guiera senegalensis</i> | 13 | 4.81 | 1.68 | 0.85 | 7.03 |
| <i>Combretum nigricans</i> | 6 | 5.53 | 2.11 | 2.21 | 7.64 |
| <i>Parkia biglobosa</i> | 6 | 5.92 | 3.32 | 0.52 | 9.88 |

Remarque : les résultats relatifs aux 85 autres espèces représentés par moins de 5 échantillons sont disponibles et figurent dans les tables générales de composition des ligneux.

Tableau VI.9 - Teneur en tanins précipitants (TP-C-AB) des fruits de ligneux (en g d'étalon - acide tanique - pour 100 g de MS)

| ESPECE | N | MOY | SD | MIN | MAX |
|-----------------------|----|------|------|------|------|
| Bauhinia rufescens | 3 | 2.93 | 0.83 | 1.98 | 3.44 |
| Pterocarpus erinaceus | 2 | 0.57 | 0.64 | 0.11 | 1.02 |
| Acacia albida | 11 | 0.72 | 0.34 | 0.24 | 1.32 |
| Acacia nilotica | 5 | 6.93 | 1.07 | 5.25 | 8.22 |
| Acacia tortilis | 6 | 1.48 | 0.96 | 0.00 | 2.94 |
| Acacia seyal | 2 | 3.35 | 0.27 | 3.16 | 3.54 |
| Acacia asak | 2 | 2.31 | 0.20 | 2.17 | 2.45 |

Les teneurs en tanins mesurées dans nos conditions varient de 0 à 11 pour 100 de la matière sèche (tableaux VI.8 et VI.9). Cette variabilité se retrouve à l'intérieur d'une même famille botanique comme en témoignent les exemples des figures VI.6 et VI.7.

Figure VI.6 - Variabilité des teneurs en tanins précipitants (TP-C-AB) des feuilles de *Mimosaceae*

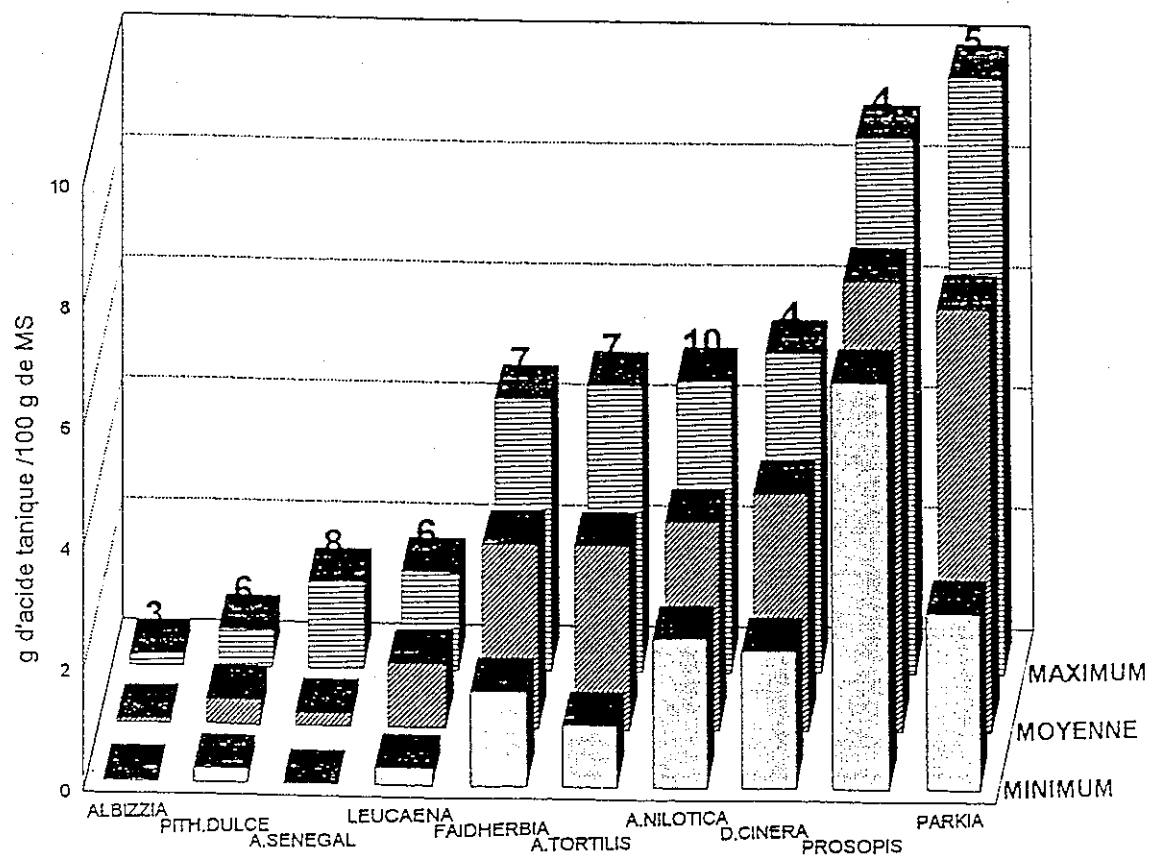
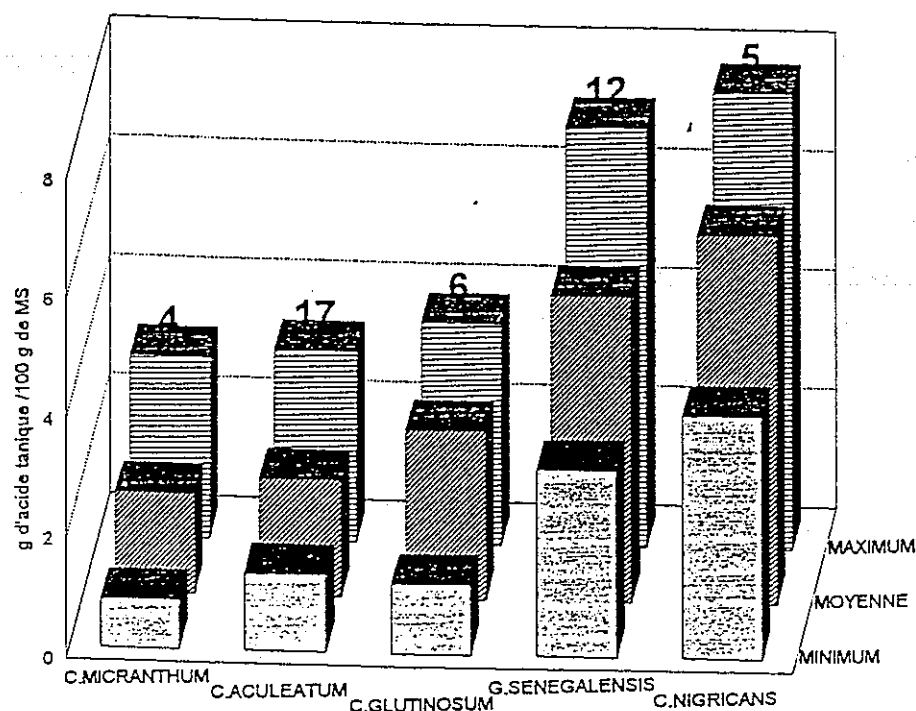


Figure VI.7 - Variabilité des teneurs en tanins précipitants (TP-C-AB) des feuilles de *Combretaceae*



Pour une même espèce, les teneurs en tanins sont fonction de l'organe analysé ; par exemple pour l'espèce *Acacia nilotica* les teneurs en tanins varient de 0,3 à 8,2 selon que les mesures sont faites sur des graines, des fleurs, des tiges, des fruits ou des feuilles (tableau VI.10.)

Tableau VI.10 - Teneur en tanins précipitants (TP-C-AB) d'*Acacia nilotica* en fonction de l'organe (acide tanique en p.100 de MS)

| ORGANES | N | MOYENNE | SD | MINIMUM | MAXIMUM |
|----------|---|---------|------|---------|---------|
| FRUITS | 5 | 6.92 | 0.95 | 5.25 | 8.22 |
| FEUILLES | 9 | 3.39 | 0.65 | 2.46 | 4.82 |
| TIGES | 4 | 2.57 | 0.87 | 1.58 | 3.9 |
| FLEURS | 2 | 2.23 | - | 2.17 | 2.29 |
| GRAINES | 2 | 0.44 | - | 0.31 | 0.58 |

Pour un même organe, les teneurs en tanin semblent varier avec le stade phénologique. Pour de nombreuses espèces on remarque une augmentation de la teneur en tanin avec l'âge des feuilles, pour d'autres on constate une diminution des tanins dans les feuilles plus âgées (tableau VI.11)

Tableau VI.11 - Teneur en tanins précipitants (TP-C-AB) en fonction du stade phénologique des feuilles (acide tanique en p.100 de MS ; moyenne de n échantillons)

| ESPECE | JEUNES | | DEVELOPPEES | | VERTES * | |
|------------------------|--------|-----|-------------|------|----------|-----|
| BAUHINIA RUFESCENS | | | 2.8 | n=3 | 4.5 | n=2 |
| COMBRETUM ACULEATUM | | | 1.6 | n=11 | 2.3 | n=6 |
| COMBRETUM LECARDII | 2.9 | n=2 | 10.4 | n=1 | | |
| COMBRETUM MICRANTHUM | 1.2 | n=3 | 7.1 | n=2 | | |
| COMBRETUM NIGRICANS | | | 7.5 | n=2 | 5.3 | n=3 |
| COMBRETUM GLUTINOSUM | | | 3.0 | n=3 | 2.1 | n=2 |
| DANIELLIA OLIVERI | | | 5.2 | n=3 | 1.0 | n=6 |
| FICUS SUR FORSK | 6.3 | n=1 | 5.2 | n=1 | 2.2 | n=3 |
| PARKIA BIGLOBOSA | | | 5.8 | n=1 | 8.7 | n=3 |
| PILIOSTIGMA THONNINGII | 1.6 | n=2 | | | 3.0 | n=3 |
| PTEROCARPUS LUCENS | 0.4 | n=1 | 1.4 | n=4 | 2.7 | n=1 |
| ACACIA TORTILIS | | | 3,8 | n=5 | 1.2 | n=2 |

* feuilles vertes : feuilles vivantes sans précision de leur stade de développement ou de leur âge

Cette remarque n'est cependant pas générale, pour certaines espèces la variabilité pour un même organe au même stade phénologique est plus importante que la variabilité liée au stade phénologique lui-même. Seul un nombre suffisant d'échantillons peut permettre de confirmer cette variabilité comme par exemple pour les feuilles de *Ficus sycomorus* (tableau VI.12)

Tableau VI.12 - Teneur en tanins précipitants (TP-C-AP) des feuilles de *Ficus sycomorus* en fonction de leur stade phénologique (acide tanique en p.100 de MS)

| FEUILLES | MOYENNE | SD | MINIMUM | MAXIMUM | N |
|-------------|---------|------|---------|---------|----|
| JEUNES | 2.98 | 0.39 | 2.59 | 3.38 | 2 |
| DEVELOPPEES | 1,89 | 1,34 | 0 | 4,76 | 11 |
| VERTES | 0.67 | 0.47 | 0. | 1.30 | 6 |

Toutes ces feuilles proviennent d'un même pays, le Cameroun.

Nous avons aussi constaté pour cette espèce une différence des teneurs en tanin des feuilles suivant l'origine géographique (tableau VI.13).

Tableau VI.13 - Teneur en tanins précipitants (TP-C-AB) des feuilles vertes de *Ficus sycomorus* suivant l'origine géographique (acide tanique en p.100 de MS)

| PAYS | MOYENNE | SD | MINIMUM | MAXIMUM | N |
|---------------|---------|------|---------|---------|---|
| CAMEROUN | 0.67 | 0.47 | 0.0 | 1.3 | 6 |
| COTE D'IVOIRE | 3.43 | 1.13 | 1.89 | 5.0 | 9 |

Il s'avère que les *Ficus sycomorus* de Côte d'Ivoire sont identifiés comme appartenant à la variété *gnaphalocarpa*, ce qui n'est pas le cas de ceux du Cameroun.

Ces différents facteurs de variation montrent à quel point il est difficile d'attribuer une teneur moyenne en tanin à une espèce. La comparaison des résultats avec ceux de la bibliographie nécessite une description très précise de l'origine des échantillons et des méthodes d'analyses. Ces informations étant rarement réunies seule une hiérarchisation comparative peut être faite. Le tableau VI.14 présente les teneurs de quelques espèces relevées dans la bibliographie et déterminées par nous-mêmes.

Tableau VI.14 - Teneur en tanins précipitants des feuilles et fruits de quelques espèces ligneuses

| FEUILLES | AUTEURS | TECHNIQUE | TENEUR EN P.100 |
|---------------------------|--------------------|-----------|-----------------|
| GLIRICIDIA SEPIUM | ONWUKA (1992) | TC-C-V | 0.0 |
| | LIM (1992) | TC-C-V | 0.1 |
| | D'MELLO (1992) | TC-C-V | 0.0 |
| | ASH (1990) | TC-C-V | 2.0 |
| | AHN et al (1989) | TC-C-Bu | 0.0 |
| | GRILLET (1992) | TP-C-AB | 0.0 |
| LEUCAENA LEUCOCEPHALA | LOHAN et al (1980) | AOAC | 1.9 |
| | D'MELLO (1992) | TC-C-V | 3.7 |
| | LIM (1992) | TC-C-V | 3.1 |
| | AHN et al (1989) | TC-C-Bu | 1.4 |
| | GRILLET (1992) | TP-C-AB | 1.1 |
| ZIZIPHUS MAURITIANA | LOHAN et al (1980) | AOAC | 2.3 |
| | GRILLET (1992) | TP-C-AB | 2.6 |
| ALCHORNEA CORDIFOLIA | ONWUKA (1992) | TC-C-V | 1.3 |
| | GRILLET (1992) | TP-C-AB | 2.5 |
| SPONDIAS MOMBIN | ONWUKA (1992) | TC-C-V | 0.2 |
| | GRILLET (1992) | TP-C-AB | 1.2 |
| CALLIENDRA CALOTHYRSUS | D'MELLO (1992) | TC-C-V | 7.9 |
| | LIM (1992) | TC-C-V | 4.4 |
| | AHN et al (1989) | TC-C-Bu | 1.5 |
| | GRILLET (1992) | TP-C-AB | 2.5 |

| FRUITS D'ACACIA | TANNER et al 1990 TC-C-Bu en DO/NDF | GRILLET 1992 TP-C-AB en p.100 |
|-----------------|--|----------------------------------|
| ALBIDA | 27 | 0.7 |
| TORTILIS | 32 | 1.5 |
| NILOTICA | 89 | 6.9 |

3. EFFETS DES TANINS SUR LA VALEUR ALIMENTAIRE DES FOURRAGES LIGNEUX

3.1. Rappels bibliographiques

3.1.1. Effet des tanins sur l'ingestion

Les fortes teneurs en tanins diminuent l'appétibilité et l'ingestion des fourrages ligneux par un phénomène d'astringence au niveau de la bouche (Goldstein *et al.* 1963, Bate-Smith 1973). Pour les espèces à teneurs moyennes, l'effet est controversé, certaines espèces améliorent la consommation de fourrages grossiers (Woodward *et al.* 1989, Reed *et al.* 1990, Gobi 1993, Cordesse, communication personnelle), d'autres provoquent une diminution de l'ingestion de ces fourrages (Tanner 1988, Reed *et al.* 1990).

L'effet n'est pas le même selon l'espèce animale considérée, les chèvres seraient moins sensibles aux fortes teneurs en tanins que les moutons ou les bovins. Cette différence pourrait être liée à la présence chez les caprins d'une protéine salivaire riche en proline qui présente une forte affinité pour les tanins (Mehansho 1987, Robbins *et al.* 1987, Burritt *et al.* 1987, Austin *et al.* 1989, D'Mello 1992).

Reed *et al.* (1990) mentionnent aussi une adaptation des moutons à la consommation d'*Acacia seyal* espèce riche en phénols.

3.1.2. Effet sur la digestibilité de la fraction fibreuse

Par fixation des enzymes bactériennes et/ou formation de complexes avec les glucides pariétaux, les tanins peuvent réduire la digestibilité de la fraction fibreuse des parois cellulaires (Barry *et al.* 1984, Barry *et al.* 1986, Reed 1986, Mueller-Harvey 1987). L'interférence des tanins avec les fractions fibreuses rend difficile, dans le cas des fourrages ligneux, la détermination de la valeur nutritive à partir de critères chimiques comme elle est habituellement pratiquée pour d'autres fourrages (Woodward *et al.* 1989).

3.1.3. Effet sur la digestibilité de l'azote

Du fait de leur propriété de former des complexes avec les protéines, les tanins affectent surtout le métabolisme azoté de l'animal (Woodward *et al.* 1989).

Dans le milieu neutre du rumen certains tanins pourraient se lier aux protéines et exercer ainsi un effet protecteur. Le complexe tanin-protéine se dissocierait au niveau de la caillette ($\text{pH} < 5$) libérant ainsi les protéines qui seraient alors assimilées au niveau de l'intestin. Seuls les tanins hydrolysables pourraient se dissocier par hydrolyse des liaisons estériques par l'acide gastrique (Driedger *et al.* Haslam 1966) ; la structure diphenyle (Haslam 1966) des proanthocyanidines (tanins condensés) rendrait difficile leur hydrolyse en milieu acide (Zelter *et al.* 1970) : les complexes tanins-protéines n'étant pas dissociés, les protéines non libérées ne sont donc pas assimilées.

Cette formation de complexes tanins-protéines entraîne une réduction de la digestibilité de l'azote. Elle se traduit chez l'animal par une augmentation de l'azote excrété dans les fèces et par une baisse du taux de fermentation ruminale d'où une baisse des pertes urinaires. En résumé, les tanins hydrolysables entraîneraient une baisse de la digestion ruminale et

des pertes urinaires d'azote, mais un accroissement de la proportion d'azote alimentaire digéré dans l'intestin, en revanche, les tanins condensés provoqueraient aussi une diminution de la digestion microbienne mais sans compensation au niveau de l'intestin. En accord avec les travaux de Nastis *et al.* (1981), Woodward (1988), Numez-Hernandez *et al.* (1989), Reed *et al.* (1990), Tanner *et al.* (1990), Coppock *et al.* (1992) font remarquer que les fourrages possédant des teneurs moyennes en tanins sont des sources de protéines intéressantes tant que l'effet négatif des tanins sur l'augmentation de l'azote fécal est inférieur à leur effet positif sur la réduction des pertes urinaires d'azote.

Pour les fourrages riches en tanins, la diminution de la rétention azotée est plus due à une diminution de l'ingestion qu'à une influence sur la digestibilité de l'azote (Holechek *et al.* 1990).

3.2. Etude expérimentale

Les teneurs en tanins ont été déterminées en priorité sur des échantillons dont la valeur nutritive a été étudiée par des méthodes *in vivo*, *in sacco* ou *in vitro* (technique du gastest cf. chapitre). Les mêmes échantillons furent aussi l'objet de mesures de dégradabilité enzymatique de la matière sèche (SMS) ou de la matière organique (SMO) par la pepsine cellulase et des matières azotées par la pronase (dMApro1) (tableau VI.15).

Les coefficients de corrélation entre les teneurs en tanins précipitants et les dégradabilités théoriques de la matière sèche ou des matières azotées sont négatifs mais non significatifs. A noter que les effectifs sont faibles. La liaison est plus étroite avec les mesures de digestibilités *in vivo* et avec celles *in vitro* (production de gaz - GP - par le gastest de Hohenheim). En revanche, la teneur en tanins explique peu les variations de dégradabilités enzymatiques de la matière organique ou des matières azotées (tableau VI.15).

Tableau VI.15 - Corrélations entre les différentes mesures de dégradabilité et les teneurs en tanins précipitants

| | IN SACCO | | IN VIVO | | GATEST | SMS | NPRO |
|---------|----------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | DT MAT | DTMS | DMS | DMO | | | |
| N | 22 | 9 | 32 | 29 | 345 | 347 | 438 |
| TP-C-AB | -0,240 | -0,448 | -0,409 | -0,436 | -0,420 | -0,282 | -0,162 |

Valeurs en gras p < 0.05

DTMA : dégradabilité théorique de la matière azotée *in sacco* (p.100).

DTMS : dégradabilité théorique de la matière sèche *in sacco* (p.100).

DMS et DMO : digestibilité de la matière sèche et de la matière organique *in vivo* (p.100).

GP : production de gaz *in vitro* par le gastest de Hohenheim.

SMS : dégradabilité enzymatique de la matière sèche par la pepsine cellulase (p.100 de MS).

dMApro1 : dégradabilité enzymatique de la matière azotée par la pronase (p.100 de MAT).

L'étude des corrélations avec les teneurs en proanthocyanidines (dosées par le butanol HCl) donne des résultats similaires tableau VI.16)

Tableau VI.16 - Corrélations entre les teneurs en tanins précipitants et en proanthocyanidines (tanins condensés) et les mesures de dégradabilité enzymatique et *in vitro*

| | GATEST | SMS | NPRO |
|---------|--------|--------|--------|
| TP-C-AB | -0.427 | -0.446 | -0.326 |
| TC-C-Bu | -0.354 | -0.391 | -0.364 |
| N | 94 | 87 | 116 |

valeur en gras $p < 0.01$

TC-C-Bu : proanthocyanidines dosées par le butanol HCl

TP-C-AB : tanin précipitant l'albumine bovine

Les résultats présentés aux tableaux VI.15 et VI.16 montrent que globalement les espèces les plus riches en tanins sont les moins digestibles mais ils ne permettent pas de conclure à un effet direct et automatique : en effet, les coefficients de corrélation intra-espèce entre les teneurs en tanins et les paramètres de digestibilité sont, soit non significatifs, soit positifs, soit négatifs (tableau VI.17).

Pour certaines espèces (par exemple, *Ziziphus mauritiana*) les corrélations sont opposées selon le stade phénologique des échantillons, pour d'autres espèces (par exemple, *Acacia tortilis*) la corrélation est opposée selon le critère de digestibilité étudié.

Tableau VI.17 - Corrélation entre les différentes mesures de dégradabilité et les teneurs en tanins : corrélation significative pour $p < 0.05$

| CORRELATION | POSITIVE | NÉGATIVE |
|----------------|---|---|
| TP-C-AB/GATEST | Acacia tortilis (7) Pithecellobium dulce (4) | Ficus sycomorus (11) Hyphaene thebaica (15) Pterocarpus erinaceus (6) Ziziphus mauritiana (5) F A Daniellia oliveri (8) |
| TP-C-AB/SMS | Acacia tortilis (4) Parkia biglobosa (6) Ziziphus mauritiana (11) F V | Acacia nilotica (8) Daniellia oliveri (7) Pericopsis laxiflora (5) |
| TP-C-AB/NPRO | Guiera senegalensis (13) Bauhinia rufescens (4) Ziziphus mauritiana (11) FV | Faidherbia albida (9) Acacia tortilis (7) |

SMS : dégradabilité de la matière sèche par la pepsine-cellulase.

NPRO : dégradabilité de la matière azotée par la pronase.

FV : feuilles vertes ; FA : feuilles âgées.

entre parenthèses : nombre d'échantillons.

Cette incohérence dans les résultats a été constatée par de très nombreux auteurs étudiant l'effet des tanins sur la digestibilité des ligneux (Lohan *et al.* 1983, Nastis *et al.* 1981, Kumar *et al.* 1984, Ahn *et al.* 1989, Nunez-Hernandez *et al.* 1989, Woodward *et al.* 1989, Holechek *et al.* 1990, Ash 1990, Reed *et al.* 1990, Coppock *et al.* 1992). Il ressort de toute cette littérature que la variabilité de l'effet des tanins est plus liée à la nature des tanins (tanins hydrolysables ou tanins condensés (proanthocyanidines)) et plus à leur concentration relative qu'à leur teneur totale (Woodward 1989), mais il n'a pas encore été possible d'attribuer des effets nutritionnels précis aux différents composés phénoliques. La concentration relative des tanins solubles et des tanins insolubles est variable au sein même d'une même espèce, elle varie en fonction de la saison (Woodward 1988), du site (Le Houérou 1980) du stockage (Rittner 1987) de l'organe (Tanner 1988) ce qui accentue la difficulté de prédire la valeur nutritive des fourrages ligneux sur la base de leur analyse chimique.

CONCLUSION

Cette étude sur les tanins des fourrages ligneux d'Afrique tropicale a été motivée par le souci d'expliquer, voir prédire, les variations de leur digestibilité en particulier celle de leurs matières azotées.

Les connaissances sur la nature chimique des tanins et leurs effets nutritionnels n'ont pas permis en début de programme de donner la priorité aux phénols totaux ou à leurs principales fractions, hydrolysables ou condensées : il était alors admis que, faute de pouvoir quantifier les effets antinutritionnels de ces fractions, il était nécessaire de procéder, de façon complémentaire, à leurs déterminations respectives ; l'opinion générale a peu varié sur ce point.

Dans un premier temps, les efforts ont cependant été concentrés sur la mise au point de techniques répétables en s'attachant à définir des méthodes standardisées de conditionnement des échantillons et d'extraction des tanins. Des essais préliminaires, inspirés de la bibliographie, ont produit les mêmes conclusions, en particulier, celles relatives au séchage : le séchage à l'étuve, à l'air ou par lyophilisation entraîne une diminution des concentrations de toutes les fractions de tanins étudiées mais les variations sont fonction de l'espèce ; toutefois, quelle que soit la technique de séchage les hiérarchies entre espèces sont conservées. Compte tenu des difficultés de transport et de conservation d'échantillons frais, il a donc été retenu de travailler avec des échantillons séchés à l'air ; Zimmer (1993) qui s'intéresse aux effets nutritionnels et métaboliques des tanins, des ligneux méditerranéens, aboutit également à la conclusion que l'on peut s'accommoder des variations de teneurs et d'effets biologiques liées au mode opératoire (séchage et broyage des échantillons, extraction des tanins), mais qu'il est indispensable de standardiser ceux-ci pour autoriser des comparaisons entre échantillons.

Néanmoins, compte tenu du grand nombre d'espèces dont il était souhaité une première connaissance qualitative, du temps nécessaire à la réalisation de plusieurs dosages par échantillon, des liaisons relativement étroites entre les résultats obtenus par les différentes méthodes de détermination des tanins totaux et de leur fraction, il a été retenu dans un premier temps de hiérarchiser les espèces suivant le principal effet biologique de leurs tanins, à savoir l'effet précipitant des protéines. L'examen des relations entre les mesures de valeurs nutritives (enzymatiques, *in vitro*,

in sacco et *in vivo*) et le pouvoir précipitant des tanins (tableau VI.16) se sont d'ailleurs avérées plus étroites que celles calculées avec les teneurs en tanins condensés considérés comme étant la fraction ayant le plus fort effet antinutritionnel (§ 3.1.3.).

Ces investigations sur 124 espèces de ligneux d'Afrique subsaharienne viennent donc compléter les travaux antérieurs (Rittner et Reed 1992, pour les plus récents) : les travaux menés jusqu'ici permettent de classer les espèces suivant les teneurs et d'établir des relations entre paramètres analytiques (fractions de tanins caractérisées par leur type chimique ; leur liaison avec les parois ou les matières azotées, leur dégradabilité enzymatique ou *in vitro*, etc.) mais ils ne suffisent pas encore à expliquer à eux seuls, de façon suffisamment fiable, pour des objectifs zootechniques ou d'aménagement agroforestier, les variations de valeur alimentaire (appétibilité, valeur énergétique, valeur azotée, site de digestion des protéines). La faiblesse de ces approches tient aussi au fait que, sauf pour les espèces sans tanins, les hiérarchies qui sont établies dépendent partiellement des méthodes de dosages retenues.

Il est nécessaire pour mieux cerner les effets zootechniques des tanins de procéder sur quelques espèces, choisies d'après leur importance pour l'élevage, à des expérimentations complètes comprenant à la fois :

- des déterminations détaillées des fractions phénoliques, par des méthodes chimiques : colorimétriques, gravimétriques, etc., sélectionnées en concertation avec d'autres équipes ;
- des méthodes physiques, HPLC en particulier, cette technique permettant de différencier les espèces par une estimation des concentrations relatives des différentes molécules appartenant à un même groupe de phénols (tanins condensés et hydrolysables préférentiellement), ce que ne permettent pas les méthodes de laboratoire usuelles. L'HPLC semble constituer un préalable indispensable à des tentatives de prédictions par les méthodes rapides telles que le SPIR (cf. chapitre VIII) ;
- des mesures des effets biologiques au laboratoire : pouvoir précipitant par une ou plusieurs méthodes retenues également de façon concertée ;
- des analyses détaillées des fractions pariétales et azotées qui interagissent avec les tanins sur la valeur nutritive ;
- des mesures enzymatiques et "*in vitro*" de la dégradabilité de la matière organique et des matières azotées. S'il est admis que ces mesures ne permettent pas d'intégrer l'ensemble des facteurs de variations de la valeur nutritive, notamment les interactions entre aliments ou la digestibilité intestinale, elles ont l'avantage de la répétabilité et, même pour les fourrages ligneux, ont fait la preuve de leur robustesse pour hiérarchiser les espèces, les organes et, dans certains cas, les stades de développement ;
- des mesures "*in situ, in sacco*" de la digestion de la matière organique, des parois et des matières azotées : ces mesures peuvent concerner, soit un aliment standard sans tanins mis en présence de rations comportant des proportions croissantes de ligneux, dont on étudiera les effets sur les autres constituants des rations, soit le ligneux lui-même. L'idéal serait de pouvoir effectuer ces mesures au niveau des différents compartiments du tube digestif comme dans les travaux de Fall Touré *et al.* 1994 (cf. chapitre IX).

- des mesures *in vivo*, des bilans azotés et des essais d'alimentation avec les mêmes rations. Des différences ayant été mises en évidence entre espèces animales, un protocole complet devrait au minimum intégrer des ovins et des caprins et, si possible, une espèce brouteuse de faune sauvage.

Une des difficultés pour mener des études complètes, telle que celle proposée ci-dessus, sur les fourrages ligneux tropicaux est l'approvisionnement régulier en ligneux en quantité suffisante, de qualité constante et dans une forme comparable à celle consommée par le cheptel : les gousses de *mimosaceae*, en particulier celles d'Acacias sahélo-soudaniens, qui contiennent suivant l'espèce entre 1 et 7 p.100 de tanins précipitants, remplissent ces conditions ; de plus, elles ont l'intérêt de jouer un rôle important dans l'alimentation du cheptel tant au pâturage que par les récoltes et le commerce qu'elles suscitent dans certains pays.

Une autre difficulté concerne les variations intra-espèce des teneurs en tanins et de leurs conséquences sur la valeur nutritive. Les quelques prélèvements guidés par les cycles phénologiques et les conditions pédoclimatiques ont conduit à des observations contradictoires d'une espèce à l'autre quant aux variations corrélatives des teneurs en tanins et celles des paramètres de digestibilité. Il est donc nécessaire, pour quelques espèces réputées fourragères, dont la composition varie significativement au cours du cycle de végétation (*Ziziphus mauritiana*,...) ou suivant l'origine géographique (*Ficus gnaphalocarpa*,...), de renouveler un échantillonnage systématique sur des organes précisément définis. Il n'est pas envisageable dans ce cas de procéder, comme avec les gousses, à des investigations complètes comprenant des mesures *in vivo*, mais l'ensemble des analyses de laboratoires évoquées précédemment sont applicables.

BIBLIOGRAPHIE

- ASH A. J. 1990 - The effect of supplementation with leaves from leguminous trees *Sesbania grandiflora*, *Albizia chinensis* and *Gliricidia sepium* on the intake and digestibility of Guinea grass hay by goats. Anim. Feed Sci. Technol. 28 : 225-232.
- AUSTIN P.J., SUCHAR L.A., ROBBINS C.T., HAGERMAN A.E. 1989 - Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle; J. Chem. Ecol. 15 : 1335-1347.
- BARRY T.N., DUNCAN S. J. 1984 - The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2 - Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. Br. J. Nutr. 51 : 493-504.
- BARRY T. N. , DUNCAN S. J. 1984 - The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 1 - Voluntary intake. Br. J. Nutr. 51 : 485-491.
- BARRY T. N., MANLEY T.R. 1986 - Interrelationships between the concentrations of total condensed tannins, free condensed tannins and lignin in *Lotus* sp. and their possible consequences in ruminant nutrition. J. Sci. Agric. 37 : 248-254.
- BATE-SMITH E.C., SWAIN T. 1962 - Flavonoid compounds. In: Comparative Biochemistry. Vol. II . Eds M. Florkin and H.S. Mason. Academic Press New-York. 755-809.
- BATE-SMITH E.C. 1973 - Haemanalysis of tannin: the concept of relative astringency. Phytochemistry, 12 : 907-912.
- BERNAYS E.A., COOPER-DRIVER G., BILGENER M. 1989 - Herbivores and plant tannins. Adv. ecol. Res. 19 : 263-303.
- BRUN N., CHEVALIER F. 1987 - Tannins et plantes destinées à la fabrication de tourteaux. Mémoire, Université Claude Bernard Lyon I. Novembre 1987.
- BRYANT J.P., CLAUSEN T.P., REICHARDT P.B., Mc CARTHY M.C., WERNER R.A. 1987. - Effect of nitrogen fertilization upon the secondary chemistry and nutritional value of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) leaves for the large aspen tortrix (*Choristoneura conflictana* (Walker)). Oecologia. 73 : 513-517.
- BURRITT E.A., MALECZEK J.C., PROVENZA F.D. 1987 Changes in concentrations of tannins, total phenolics, crude protein and in vitro digestibility of browse due to mastication and insalivation by cattle. J. Range Mgmt. 40 (5) : 409-411.
- CARRERA G.S., MITJAVILA R., DERACHE R. 1973 - Effect of tannic acid on the digestive availability of vitamin B12 in the rat. Annls Nutr. Alim. 27 : 73-82.
- COLEY P.D. 1983 - Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. Ecological Monographs. 53 : 209-233.

- COLEY P.D., BRYANT J. P., CHAPIN S. 1985 - Resource availability and plant antiherbivore defense. *Sci.* 230 : 895-899.
- COPPOCK D.L., REED J.D. 1992 - Cultivated and native browse legumes as calf supplements in Ethiopia. *J. Range Mgmt.* 45 : 231-238.
- D'MELLO J.P.F. 1992 - Chemical constraints to the use of tropical legumes in animal nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 38 : 237-261.
- DAWRA R.K., MAKKAR H.P.S., SINGH B. 1988 - Protein-binding capacity of microquantities of tannins. *Analytical Biochemistry* 170 : 50-53.
- DESHPANDE S.S., CHERYAN M., SALUNKHE D.K. 1986 - Tannin analysis of food products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 24 (4) : 401-449.
- DESHPANDE S.S., CHERYAN M. 1987 - Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J. Food Sci.* 332-334.
- DIAGAYETE M., HUSS W. 1982 - Tannin contents of african pasture plants: their effects on analytical data and in vitro digestibility. *Anim. Res. Devel.* 15 : 79-90.
- DRIEDGER A., HATFIELD E.E. 1972 - Influence of tannins of the nutritive value of soybean for ruminants. *J. Anim. Sci.* 34 : 465-468.
- FALL TOURE S., MICHALET DOREAU B., PONCET C. 1994 - Post-ruminal degradation of nitrogen in tropical browse plants compared to lucerne hay. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 3 : 60.
- GOBI, 1993 - Gestion d'un parcours de suberaie emmaquisée par des chèvres laitières. Comment concilier les exigences métaboliques des animaux avec les contraintes d'entretien du milieu. Thèse de doctorat de l'Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier. 134 p.
- GOLDSTEIN J.L., SWAIN T. 1963 - Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry.* 2 : 371-383.
- GRILLET C. 1992 - Dosages des tanins dans les fourrages ligneux : mises au point de techniques. Rapport préliminaire. Juillet 1992. CIRAD-EMVT. 16 pages.
- GRILLET C. 1992 - Dosages des tanins précipitants des fourrages ligneux. Rapport d'activité 1992. CIRAD-EMVT. 10 pages.
- GRILLET C. 1993 - Visit at NRI - Livestock production 19 april-14 may 1993. Chatham maritime. 9 p.
- GUPTA R.K., HASLAM E. 1979 - Vegetable tannins: structure and biosynthesis, in Polyphenols in Cereals and legumes. Ed Hulse J.H., International Development Research Center, Ottawa, Canada. pages 15-24.
- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G. 1978 - Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.* 26 (4) : 809-812.

- HAGERMAN A.E. 1987 - Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chemical Ecology* 13 (3) : 437-449.
- HAHN D.H., ROONEY L.W., EARP C.F. 1984 - Tannin and phenols of sorghum. *Cereal Foods World*. 29 : 776-779.
- HARTLEY R.D. 1981 - Chemical constitution, properties and processing of lignocellulosic wastes in relation to nutritional quality for animals. *Agric. Environ.* 6 : 91-113.
- HASLAM E. 1966 - Chemistry of vegetable tannins. Academic Press, London. P. 179.
- HO AHN J., ROBERTSON B.M., ELLIOTT R. GUTTERIDGE R.C., FORD C.W. 1989 - Quality assessment of tropical browse legumes: tannin content and protein degradation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 27 (1-2) : 147-156.
- HOLECHEK J.L., MUNSHIKPU A.V., SAIWANA L., NUNEZ-HERNANDEZ G., VALDEZ R., WALLACE J.D., CARDENAS M. 1990 - Influences of six shrub diets varying in phenol content on intake and nitrogen retention by goats. *Trop. grasslands*. 24 (2) : 93-98.
- KUHLE S., EBMEIER C. 1981 - Untersuchungen zum tanningehalt in ackerbohnen. 1- Methodische untersuchungen zur bestimmung der kondensierten tannine in ackerbohnen. *Arch. Tierern.* 32 : 277-285.
- KUMAR R., SINGH M. 1984 - Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 32 : 447-453.
- LE HOUEROU H.N. 1980 - Les fourrages ligneux en Afrique du Nord. In: Les fourrages ligneux en Afrique : état actuel des connaissances. Publié sous la direction de H.N. Le Houérou. Communication présentée au colloque international sur les fourrages ligneux en Afrique, Addis-Ababa 8-12 avril 1980. CIPEA , Addis-Ababa, Ethiopie. P. 57-84.
- LEINMÜLLER E. 1989 - Wirkungen tanninhaltiger futtermittel auf den protein und kohlenhydratstoffwechsel in pansensaft in vitro. Thèse de l'Université de Hohenheim. Octobre 1989. 160 p.
- LEINMÜLLER E., STEINGASS H., MENKE K.H. 1991 - Tannins in ruminant feedstuffs. *Anim. Res. Dev.* 33 : 9-62.
- LIM F. 1992 - Tannin content in some animal feedsuffs. *Proc. 15th MSPA Ann. Conf. MARDI* : 87-89.
- LOHAN O.P., LALL D., NEGI S.S. 1983 - Partitioning of total tannins in some tree fodders in condensed and hydrolysable forms. *Indian J. Anim. Sci.* 53 : 1333-1335.
- MAKKAR H.P.S. 1989 - Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. *J. Agric. Food Chem.* 37 : 1197-1202.
- MARIGO G. 1973 - Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analisis*, 2 (2) : 106-110.

- MASQUELIER J., MICHAUD J., BRONNUN-HANSEN K. 1979 - Recherche et dosage des oligomères flavanoliques dans les aliments d'origine végétale. Compte rendu de l'Assemblée générale annuelle du groupe polyphénols. Logrono, Espagne 2-4 mai 1979.
- Mc LEOD M.N. 1974 - Plant tannins in forage quality. *Nutr. Abst. Rev.* 44 : 803-812.
- MEHANSHO H., BUTLER L.G., CARLSON D.M. 1987 - Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interaction, induction and defense mechanisms. *Ann. Rev. Nutr.* 7 : 423-440.
- MOLE S., WATERMAN P.G. 1987 - A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia (Berlin)* 72 : 137-156.
- MOLE S., ROSS J.A.M., WATERMAN R.G. 1988 - Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. 1 Chemical changes. *J. Chem. Ecol.* 14 : 1-21.
- MUELLER-HARVEY I., Mc ALLAN A.B., THEODOROU M.K., BEEVER D.E. 1987 - Phenolics in fibrous crop residues and plants and their effects on the digestion and utilisation of carbohydrates and proteins in ruminants. In plant breeding and the nutritive value of crop residues. Proceedings of a workshop held at ILCA Addis-Ababa, Ethiopia. 7-10 December 1987. Edited by Reed J.D., Capper B.S., Neate P.J.H. P. 97-132.
- NASTIS A.S., MALECZEK J.C. 1981 - Digestion and utilization of nutrients in oak browse by goats. *J. Anim. Sci.* 53 : 283-290.
- NUNEZ-HERNANDEZ G., HOLECHEK J. L., WALLACE J.D., GALYEAN M.L., TEMBO A., VALDEZ R., CARDENAS M. 1989 - Influence of native shrubs on nutritional status of goats: Nitrogen retention. *J. Range Mgmt.* 39 : 5-7.
- ONWUKA C.F.I. 1992 - Tannin and saponin contents of some tropical browse species fed to goats. *Trop. Agric. (Trinidad)*. 69 (2) : 176-180.
- PRICE M.L., BUTLER L.G. 1977 - Rapid visual estimation and spectrometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 25 : 1268-1273.
- PRICE M.L., VAN SCOYOC S., BUTLER L.G. 1978 - A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26 : 1214.
- RAO P.U., DEOSTHALE Y.G. 1988 - In vitro availability of iron and zinc in white and coloured ragi (*Eleusine coracana*): role of tannin and phytate. *Plant Foods for Human Nutr.* 38 : 35-41.
- REDDY N.R., PIERSON M.D., SATHE S.K., SALUNKHE D.K. 1985 - Dry bean tannins: a review of nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62 : 541-549.
- REED J.D. 1986 - Relationships among soluble phenolics, insoluble proanthocyanidins and fiber in east african browse species. *J. of Range Management* 39 (1): 5-7.

- REED J.D., HORVATH P.J., ALLEN M.S. Van SOEST P.J. 1985 - Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium. *J. Sci. Fd. Agric.* 36 : 255-261.
- REED J.D., SOLLER H., WOODWARD A. 1990 - Fodder tree and straw diets for sheep: intake, growth, digestibility and the effects of phenolics on nitrogen utilisation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30 (1-2) : 39-50.
- RIBEREAU-GAYON 1968 - Les composés phénoliques des végétaux. Dunod éd., Paris.
- RICKARD J.E. 1986 - Tanin levels in Cassava, a comparison of method of analysis. *J. Sci. Fd. Agric.* 37 : 37-42 .
- RITTNER U. 1987 - Polyphenolic compounds including tannins in Ethiopian browse species and their biological effects when fed to small ruminants. Mémoire de maîtrise, Université de Hohenheim, Stuttgart (A). 64 p.
- RITTNER U. and REED J.D. 1992 - Phenolics and *In vitro* Degradability of Protein and Fibre in West African Browse. *J. Sci. Food Agric.*, 58 : 21-28.
- ROBBINS C.T., MOLE S., HAGERMAN A.E., HANLEY T.A. 1987 - Role of tannins in defending plants against ruminants. Reduction in dry matter digestion ? *Ecology*. 68 : 1606-1615.
- SCALBERT A., MONTIES B., JANIN G. 1987 - Comparaison de méthodes de dosage des tanins: application à des bois de différentes espèces. 2e colloque Sciences et Industries du bois, tome II, thèmes 3, 4 et 5.
- SINGLETON V.L. 1981 - Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.* 27 : 149-242.
- SWAIN T. 1965 - The tannins, in plant biochemistry. p 552. Bonner J. and Varner E. V. Ed., Academic Press, New York.
- TANNER J.C. 1988 - Acacia fruit supplementation of maize stover diets fed to sheep. Mémoire de maîtrise, Université de Reading, (R.U.). 66 p.
- TANNER J.C., REED J. D., OWENS E. 1990 - The nutritive value of fruits (pods with seeds) from four Acacia species compared with extracted noug (*Guizotia abyssinica*) meal as supplements to maize stover for Ethiopian highland sheep. *Anim. Prod.* 51 : 127-133.
- TERRILL T.H., WINDHAM W.R., HOVELAND C.S., AMOS H.E. 1989 - Forage preservation method influences on tannin concentration, uptake and digestibility of *Sericea lespedeza* by sheep. *Agron. J.* 81 (3) : 435-439.
- TERRILL T.H., WINDHAM W.R., EVANS J.J., HOVELAND C.S. 1990 - Condensed tannin concentration in *Sericea lespedeza* as influenced by preservation method. *In: Crop Sci.* 30 : 219-224.
- VILLENEUVE F. 1991 - Rapport préliminaire sur le dosage des tanins. CIRAD-CTFT. Mars 1991. Projet CEE-DGXII-ST2/215. 8 p.

VILLENEUVE F. 1991 - Dosage des tanins dans les fourrages ligneux. Rapport d'activité 1991 CIRAD-CTFT. Projet CEE-DGXII-ST2/215. 26 p.

WATERMAN P.G., MBI C.N., MC KEY D.B., GARTLAN J.S. 1980 - African rain forest vegetation and rumen microbes: phenolic compounds and nutrients as correlates of digestibility. *Oecologia* (Berlin). 47 : 22-33.

WATERMAN P., MOLE S. 1989 - Factors influencing the shikimate pathway in plants. Ed. E.A. Bernays CRC Press, Boca Raton, Florida. in *Focus on plant insect interactions* Vol. 1.

WOODWARD A. 1988 - Chemical composition of browse in relation to relative consumption of species and nitrogen metabolism of livestock in southern Ethiopia. Thèse de Doctorat, Cornell University, Ithaca, New York (USA). 195 p.

WOODWARD A., REED J.D. 1989 - Influence des substances polyphénoliques sur la valeur nutritive des fourrages ligneux : synthèse des recherches menées par le CIPEA. *Bulletin du CIPEA* 35 : 2-13.

ZELTER S.Z., LEROY F., TISSIER J. P. 1970 - Protection des protéines alimentaires contre les bactéries dans le rumen. *Annls Biol. anim., Biochim., Biophys.*, 10 : 111-122.

ZIMMER Nicole. 1993 - Dosage des polyphénols. Communication à la réunion du groupe "Evaluation des ressources fourragères locales dans les régions méditerranéennes". Contrat no.8001-CT.900022. Thessalonique, Grèce, 27-29 septembre 1993 : 15 p.

Communications personnelles : René CORDESSE - Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier - membre d'un groupe de travail international sur les tanins "groupe Polyphenols".